

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

JULIANA ZANATTA DE CARVALHO DIAS

**AVALIAÇÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA DA PRESENÇA DE QSOX1
(QUIESCINA/SULFIDRIL OXIDASE1) E FIBRONECTINA NA REESTENOSE PÓS-
LESÃO POR CATETER-BALÃO EM CARÓTIDAS DE RATO**

CURITIBA

2010

JULIANA ZANATTA DE CARVALHO DIAS

**AVALIAÇÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA DA PRESENÇA DE QSOX1
(QUIESCINA/SULFIDRIL OXIDASE1) E FIBRONECTINA NA REESTENOSE PÓS-
LESÃO POR CATETER-BALÃO EM CARÓTIDAS DE RATO**

Monografia apresentada à disciplina de Estágio em Patologia Básica como requisito parcial à conclusão do Curso de Ciências Biológicas, Setor de Ciências Biológicas, Departamento de Patologia Básica, Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Prof^a. Lia Sumie Nakao

Co-orientador: Axel Helmut Rulf Cofré

CURITIBA

2010

DEDICATÓRIA

Aos que me orientaram.

A qualquer um que possa ter concebido uma idéia que tenha me inspirado.

Aos meus amores.

AGRADECIMENTOS

À professora Lia Sumie Nakao pela orientação extremamente dedicada.

Ao mestrando Axel Helmut Rulf Cofré por toda a paciência, conhecimento e preocupações compartilhados.

Ao ex-mestrando Joselito Getz pelo material compartilhado.

Ao professor Sílvio Sanches do Departamento de Biologia Celular da UFPR, por ceder uma amostra do anticorpo anti-FN, utilizado como controle dos experimentos.

À professora Elisabeth Moraes do Laboratório de Neurobiologia da UFPR, pelas discussões extremamente proveitosas sobre a melhor utilização de lâminas.

Ao professor Rubens Bertazolli Filho do Departamento de Biologia Celular da UFPR, pela luz às imuno-histoquímicas frustradas.

RESUMO

O presente trabalho tem por objetivo caracterizar brevemente o sistema vascular e os seus principais componentes, visando discutir: 1) a lesão de estreitamento ou obstrução total do lúmen por aterosclerose; 2) a principal opção terapêutica para essa patologia – a angioplastia; 3) a complicação posterior a esse procedimento – a reestenose; 4) o modelo animal utilizado para investigar experimentalmente a reestenose – a lesão arterial por cateter-balão em carótida de ratos; 5) o papel e 6) a presença das proteínas Quiescina/Sulfidril Oxidase1 (QSOX1) e Fibronectina nos tecidos lesados. Para tanto, a presença dos antígenos foi qualificada após reações imuno-histoquímicas em tecidos com 1, 7, 14 e 21 dias de lesão por cateter-balão e sham e semiquantificada através do software Image ProPlus 6.1.

Palavras-chave: Aterosclerose. Angioplastia. Cateter-balão. Reestenose. QSOX1. Fibronectina. Imuno-histoquímica.

ABSTRACT

This paper aims to briefly characterize the vascular system and its main components, discussing: 1) the process of narrowing or total obstruction of arterial lumen by atherosclerosis; 2) the main treatment option for this disease - angioplasty; 3) a further complication to this procedure – restenosis; 4) the animal model employed to investigate experimental restenosis – injury by balloon catheter in rat carotid artery, 5) the role, and 6) the presence of the proteins Quiescin/Sulfhydryl Oxidase1 (QSOX1) and Fibronectin in such injured tissues. Therefore, the presence of antigens was qualified by performing immunohistochemical in tissues at 1, 7, 14 and 21 days of injury by balloon catheter and sham, and semiquantified using the software Image ProPlus 6.1.

Key words: Atherosclerosis. Angioplasty. Balloon Catheter. Restenosis. QSOX1. Fibronectin. Immunohistochemical.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 – AS CAMADAS QUE FORMAM A PAREDE DOS VASOS SANGUÍNEOS E SEUS CONSTITUINTES BÁSICOS.....	14
FIGURA 2 – DIAGRAMA ESQUEMÁTICO DA SEQUÊNCIA DE INTERAÇÕES QUE OCORREM NA LESÃO INICIAL DA ATEROSCLEROSE.....	17
FIGURA 3 – EVOLUÇÃO DAS ALTERAÇÕES NA PAREDE ARTERIAL NA HIPÓTESE DA RESPOSTA A LESÃO.....	18
FIGURA 4 – PRINCIPAIS COMPONENTES DE UM ATEROMA TÍPICO, SOBREJACENTE A UMA MÉDIA INTACTA.....	19
FIGURA 5 – OS PRINCIPAIS EVENTOS PATOGÊNICOS E AS COMPLICAÇÕES CLÍNICAS DA ATEROSCLEROSE	20
FIGURA 6 – ANGIOPLASTIA TRANSLUMINAL CORONARIANA POR CATETER-BALÃO	21
FIGURA 7 – ANGIOPLASTIA TRANSLUMINAL CORONARIANA POR CATETER-BALÃO COM A COLOCAÇÃO DE <i>STENT</i>	23
FIGURA 8 – REESTENOSE COM A PRESENÇA DE <i>STENT</i>	27
FIGURA 9 – ESTRUTURA DO GENE QSOX EM MAMÍFEROS	32
FIGURA 10 – REPRESENTAÇÃO TRIDIMENSIONAL DA PROTEÍNA QSOX MONOMÉRICA	32
FIGURA 11 – ESTRUTURA MODULAR DA FN	34
FIGURA 12 – PRINCIPAIS ETAPAS DA MONTAGEM DA FIBRA DE FN	36
FIGURA 13 – ANGIOPLASTIA COM CATETER-BALÃO EM RATOS.....	37
FIGURA 14 – DETALHE DA ANGIOPLASTIA TRANSLUMINAL CORONARIANA POR CATETER-BALÃO EM CARÓTIDA ESQUERDA DE RATOS WISTAR	40
FIGURA 15 – POLÍGONOS MULTIPONTOS.....	42
FIGURA 16 – REGIÕES DELIMITADAS PELOS POLÍGONOS MULTIPONTOS: MÉDIA E NEOÍNTIMA	42
FIGURA 17 – PIXELS: UNIDADES FORMADORAS DE IMAGEM.....	45
FIGURA 18 – O SISTEMA RGB.....	46

FIGURA 19 – JANELA DE CALIBRAÇÃO DO PROGRAMA IMAGE PROPLUS 6.0	47
FIGURA 20 – REPRESENTAÇÃO DAS QUATRO AMOSTRAS DA CAMADA ÍNTIMA OBTIDAS EM CADA CORTE	48
FIGURA 21 – PIXELS CONSIDERADOS MARCADOS NUMA AMOSTRA, APÓS A CALIBRAÇÃO DO CORTE	48
FIGURA 22 – RELAÇÃO NEOÍNTIMA-MÉDIA NA PROGRESSÃO DA REESTENOSE	50
FIGURA 23 – CONTROLE POSITIVO	51
FIGURA 24 – IDENTIFICAÇÃO DA PRESENÇA DE QSOX EM CARÓTIDAS LESIONADAS.....	53
FIGURA 25 – RESULTADO DO BLOQUEIO DO ANTICORPO ANTI-BSA EM WESTERN BLOT	54
FIGURA 26 – BLOQUEIO DO ANTICORPO ANTI-BSA EM CORTES DE CARÓTIDAS	55
FIGURA 27 – LESÕES SHAM CORADAS COM ANTI-FN	56
FIGURA 28 – IDENTIFICAÇÃO DA PRESENÇA DE FN	57
FIGURA 29 – ANÁLISE DENSITOMÉTRICA PARA A PRESENÇA DE QSOX	59
FIGURA 30 – ANÁLISE DENSITOMÉTRICA PARA A PRESENÇA DE FN	59
TABELA 1 – INFORMAÇÕES SOBRE OS RATOS PREPARADOS PELO MESTRANDO AXEL HELMUT RULF COFRÉ	40

LISTA DE SIGLAS

aa	-	Aminoácidos
ATC	-	Angioplastia Transluminal Coronariana
BSA	-	Albumina de Soro Bovino
CE	-	Células Endoteliais
DAB	-	Diaminobenzidina
DO	-	Densidade Ótica
DOI	-	Densidade Ótica Integrada
EGF	-	Fator de Crescimento Epidermal
FGF	-	Fator de Crescimento Fibroblástico
FN	-	Fibronectina
HE	-	Hematoxilina-Eosina
H ₂ O ₂	-	Peróxido de Hidrogênio
IHQ	-	Imuno-Histoquímica
LDL	-	<i>Low Density Lipoprotein</i>
MEC	-	Matriz Extracelular
NO	-	Óxido Nítrico
NOS	-	Óxido Nítrico Sintase
Nox	-	<i>Non-phagocytic</i> NAD(P)H Oxidase
PBS	-	Solução Salina Tamponada com Fosfato
PDGF	-	Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas
PGI ₂		Prostaciclina
Phox	-	<i>Phagocytic</i> NAD(P)H Oxidase
QSOX1	-	Quiescina/Sulfidril Oxidase1
ROS	-	Espécies Reativas de Oxigênio
TGFβ	-	Fator de Crescimento Transformador Beta
Trx	-	Tiorredoxina
TrxR	-	Tiorredoxina Redutase
VSMC	-	Células Musculares Lisas Vasculares

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
2 OBJETIVOS.....	12
2.1 OBJETIVO GERAL	12
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	12
3 REVISÃO DA LITERATURA	13
3.1 O SISTEMA VASCULAR.....	13
3.2 DISTÚRBIOS VASCULARES	15
3.3 ATEROSCLEROSE	16
3.4 ANGIOPLASTIA	20
3.5 REESTENOSE.....	23
3.5.1 Processos <i>redox</i>	29
3.5.1.1 QSOX1	31
3.5.2 Fibronectina.....	33
3.6 MODELO ANIMAL	36
4 MATERIAIS E MÉTODOS	39
4.1 LESÃO ARTERIAL.....	39
4.2 PREPARAÇÃO DO TECIDO.....	41
4.3 COLORAÇÃO	41
4.4 DENSITOMETRIA.....	44
5 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	50
5.1 RELAÇÃO ÍNTIMA-MÉDIA.....	50
5.2 IMUNO-HISTOQUÍMICA (IHQ)	51
5.2.1 Anti-QSOX.....	52
5.2.2 Anti-FN	54
5.3 ANÁLISE DENSITOMÉTRICA	58
6 CONCLUSÃO	62
REFERÊNCIAS.....	63
ANEXOS	70

1 INTRODUÇÃO

Apesar dos avanços terapêuticos, a doença cardiovascular, em especial as doenças arteriais, são as principais responsáveis pela mortalidade nos diversos grupos de doenças humanas (FONSECA *et al.*, 2010).

Segundo Robbins *et al.* (2008), as lesões mais significativas clinicamente envolvem as artérias e os dois principais eventos que identificam a patologia vascular são:

- a) estreitamento ou obstrução total do lúmen dos vasos, tanto progressivamente (por aterosclerose) quanto abruptamente (por trombose ou embolia);
- b) enfraquecimento das paredes vasculares, causando a sua dilatação e/ou ruptura.

Conhecer o funcionamento do sistema vascular, seus componentes, suas interações e, principalmente, suas respostas adaptativas às necessidades atípicas auxilia na compreensão das condições patológicas e de seus mecanismos. Isso pode gerar novas opções terapêuticas para o tratamento e prevenção das lesões citadas (ROBBINS *et al.*, 2008).

A lesão progressiva por aterosclerose, por exemplo, depende do acúmulo de colesterol, da ativação de células inflamatórias, de sais insolúveis de cálcio e outras substâncias na parede das artérias. Desse acúmulo formam-se as placas que podem causar a obstrução, total ou parcial, do vaso podendo levar a infarto do miocárdio e acidente vascular cerebral. Nas sociedades ocidentais, a aterosclerose é responsável por 50% das mortes relacionadas a estes processos (GOTTLIEB; BONARDI; MORIGUCHI, 2005; CHEEMA, 2006)

Assim sendo, a angioplastia transluminal coronariana surgiu como uma forma de tratamento para a aterosclerose e, desde sua implantação por Andreas Grüntzig em 1977, adquiriu papel destacado no manejo da cardiopatia isquêmica (CARAMORI; YAMAMOTO; ZAGO, 1997). Através da insuflação do cateter-balão e fricção deste no local em que se encontra a placa aterosclerótica, esta será comprimida e destruída, desobstruindo o lúmen do vaso. Esse processo ocasiona desnudação endotelial, podendo acarretar complicações pós-cirúrgicas. A reestenose é a complicação pós-cirúrgica mais frequente, ocorrendo em 20 a 40%

das obstruções inicialmente dilatadas com sucesso (CARAMORI; YAMAMOTO; ZAGO, 1997).

O presente trabalho teórico tem por objetivo caracterizar brevemente o sistema vascular e seus principais componentes, visando discutir:

- a) a lesão de estreitamento ou obstrução total do lúmen por aterosclerose;
- b) a principal opção terapêutica para essa patologia – a angioplastia;
- c) a complicação posterior a esse procedimento – a reestenose;
- d) o modelo animal utilizado para representar a reestenose – a lesão arterial por cateter-balão em carótida de ratos;
- e) discutir o papel e detectar a presença das proteínas Quiescina/Sulfidril Oxidase (QSOX) e Fibronectina (FN) em tecidos lesados.

Para obtenção dos resultados foram realizadas imuno-histoquímicas (IHQ) em tecidos com 1, 7, 14 e 21 dias de lesão por cateter-balão e sham, que permitiram detectar a presença dos antígenos citados e realizar análises densitométricas, a fim de quantificá-los.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo geral deste projeto é verificar e quantificar, através de técnicas imunohistológicas e análises densitométricas, a expressão de QSOX e FN em carótidas de ratos que sofreram injúria pelo modelo experimental de lesão arterial por cateter-balão.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Analisar a proporção entre a área da camada neoíntima formada pela reestenose e a área da camada média em cortes corados com Hematoxilina-Eosina (HE);
- b) Qualificar através de IHQ a expressão da QSOX e FN em carótidas de ratos com lesões de 1, 7, 14 e 21 dias por cateter-balão e sham;
- c) Quantificar através de densitometria (Image Pro-Plus 6.1) a expressão destas mesmas proteínas.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 O SISTEMA VASCULAR

Os vasos sanguíneos que abrangem o sistema vascular possuem composição e arquitetura semelhante morfológicamente ao longo de todo o sistema, havendo modificações apenas na configuração e na quantidade relativa dos constituintes básicos que formam as paredes dos vasos, visando atender às necessidades mecânicas ou metabólicas locais. Esses constituintes são: as células endoteliais (CE), ou coletivamente denominadas endotélio, as células musculares lisas (VSMC) e a matriz extracelular (MEC), que inclui elastina, colágeno e glicosaminoglicanos. As variações estruturais de um local para outro ocorrem, principalmente, nas camadas formadas por VSMC e por MEC (ROBBINS *et al.*, 2005).

De acordo com seus tamanhos e características estruturais as artérias podem ser classificadas em três tipos: artérias elásticas ou de grande calibre – aorta e seus grandes ramos; artérias musculares ou de médio calibre – ramos menores da aorta; e artérias de pequeno calibre e arteríolas – irrigam interior de tecidos e órgãos (ROBBINS *et al.*, 2005).

Segundo Robbins *et al.* (2005), morfológicamente identifica-se a seguinte configuração dos componentes básicos formando as paredes dos vasos de maior calibre (Figura 1):

- a) uma camada de CE e quantidade reduzida de tecido conjuntivo frouxo subendotelial, formando a camada íntima;
- b) uma lâmina elástica interna (membrana elástica densa), separando as camadas íntima e média;
- c) diversas camadas de VSMC, formando a camada média – nas artérias elásticas a média é rica em fibras elásticas organizadas em camadas compactas separadas e alternadas por camadas de células musculares lisas, que são nutridas tanto por difusão quanto por *vasa vasorum* (arteríolas provenientes de fora do vaso);
- d) uma lâmina elástica externa (membrana elástica densa), separando as camadas média e adventícia e

- e) a camada de MEC, contendo fibroblastos dispostos longitudinalmente, fibras nervosas e *vasa vasorum* formando a camada adventícia.

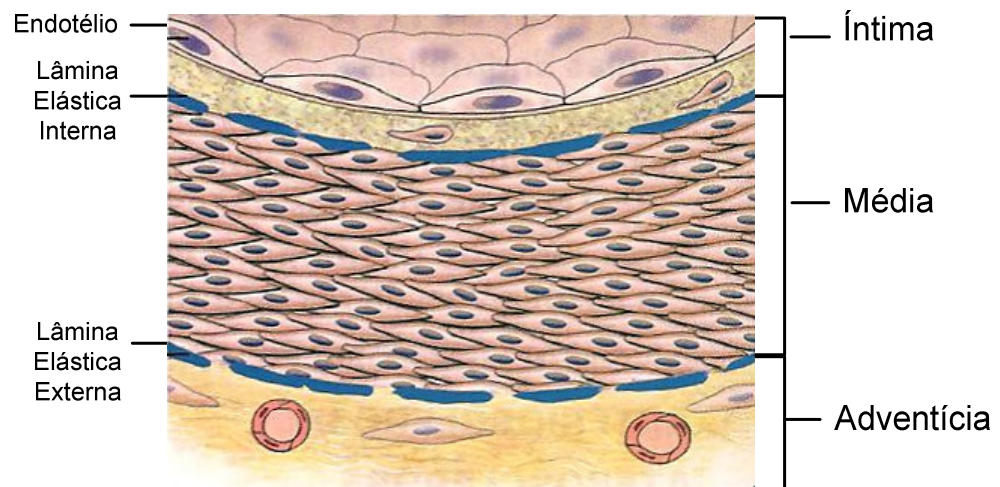


FIGURA 1 – AS CAMADAS QUE FORMAM A PAREDE DOS VASOS SANGÜÍNEOS E SEUS CONSTITUINTES BÁSICOS

FONTE: Adaptado de Robbins *et al.* (2005).

As células do tecido vascular possuem um funcionamento integrado essencial para os mecanismos de desenvolvimento do sistema e resposta da vasculatura a estímulos hemodinâmicos, bioquímicos e patológicos (GIMBRONE *et al.*, 2006).

As CE, que formam o revestimento contínuo da parede vascular com a espessura de apenas uma célula, devem estar íntegras. Delas dependem a manutenção da homeostase do vaso e a transferência de constituintes do sangue circulante para os tecidos e órgãos, através das junções intercelulares, que, em geral, são impermeáveis às grandes moléculas. Estruturalmente intactas elas respondem a uma variedade de estímulos fisiopatológicos ajustando suas funções habituais (constitutivas) e expressando novas propriedades adquiridas (induzidas) – um processo denominado ativação endotelial. Os indutores da ativação endotelial são citocinas; agentes vasoativos; produtos bacterianos; estresse hemodinâmico; produtos lipídicos; produtos finais da glicosilação avançada; vírus; componentes do complemento, hipóxia entre outros (HANSSON, 2005; GIMBRONE *et al.*, 2006).

As CE apresentam organelas denominadas corpos de Weibel-Palade, cuja função é armazenar P-Selectina, proteína mediadora na ligação de neutrófilos, linfócitos T e monócitos ao endotélio, para que haja transferência destas células

através das junções intercelulares, relativamente instáveis quando ocorre ativação endotelial (HANSSON, 2005; ROBBINS *et al.*, 2008).

As CE também influenciam a reatividade das VSMC subjacentes – responsáveis pela vasoconstrição e vasodilatação – através da produção de fatores de relaxamento, como prostaciclina (PGI₂) e óxido nítrico (NO) e fatores de contração, como a endotelina, ou pela absorção de fármacos (GIMBRONE *et al.*, 2006; ROBBINS *et al.*, 2008).

3.2 DISTÚRBIOS VASCULARES

Segundo Robbins *et al.* (2008), a disfunção endotelial caracterizada por um fenótipo alterado que prejudica a reatividade vascular ou que induz uma superfície trombogênica ou anormalmente aderente às células inflamatórias, é responsável, ao menos em parte, pelo início da formação de trombo, de aterosclerose e de lesões vasculares da hipertensão ou outros transtornos.

Lesões vasculares com perda aguda de CE (desnudação) estimulam trombose e proliferação das VSMC. A resposta fisiológica adaptativa padrão para que haja reconstrução da parede vascular é a formação da neointima, que ocorre através da migração das VSMC da média para a íntima. Na íntima, essas células sofrem uma espécie de desdiferenciação, em que deixam de ser contráteis – ou seja, há redução dos filamentos contráteis –, adquirem a capacidade de proliferação e passam a sintetizar MEC através do desenvolvimento de organelas envolvidas na síntese protéica – retículo endoplasmático granular e Golgi (ROSS, 1999; ROBBINS *et al.*, 2008).

As VSMC que proliferaram na íntima podem retornar ao seu estado não-proliferativo após a reconstituição da camada endotelial subjacente, quando a estimulação aguda ou crônica cessar. No entanto uma resposta exagerada de cicatrização provoca o espessamento ou a hiperplasia da íntima, em que o novo endotélio formado por diversas camadas de VSMC pode resultar em estenose (LIBBY; THEROUX, 2005).

Atualmente, muitos estudos usam a equalização na proporção íntima-média como um marcador precoce da aterosclerose. Porém, deve-se levar em consideração que o espessamento da íntima ocorre como um processo natural do

envelhecimento, também resultando em artérias com a espessura das camadas íntima e média aproximadamente igual. A ausência de fatores indutores desse tipo de espessamento sugere que o espessamento em si não é suficiente para caracterizar doenças cardiovasculares (ROBBINS *et al.*, 2008; CORRADO *et al.*, 2010).

3.3 ATEROSCLEROSE

A palavra aterosclerose deriva do grego em que *atero* significa caldo ou pasta e *esclerose* corresponde a endurecimento. A aterosclerose, segundo a hipótese da resposta à lesão, se inicia com lesão ou ativação endotelial causada, por exemplo, por altos níveis séricos de colesterol e triglicerídeos, associados à pressão arterial elevada (CHEEMA, 2006).

A desnudação endotelial crônica ou repetitiva pode ser causada por forças hemodinâmicas, por depósito de complexo imune, irradiação, produtos químicos ou, experimentalmente, por fricção. A progressão da lesão resulta em espessamento da íntima e formação de ateromas quando associada a dietas ricas em lipídios – hiperlipidemia (ROBBINS *et al.*, 2008).

A hiperlipidemia crônica favorece a deposição de lipoproteínas, principalmente LDL (*Low Density Lipoprotein*) na íntima. Essa deposição tende a ocorrer nos forames e nos pontos de ramificação dos vasos existentes, onde existem padrões alterados na turbulência do fluxo sanguíneo. Esses lipídios que se acumulam no endotélio serão oxidados por espécies reativas de oxigênio (ROS), liberadas pelas CE e por macrófagos ativados. O excesso de ROS diminui a biodisponibilidade do NO produzido pelas CE, ocasionando a diminuição da atividade vasodilatadora, aumentando o risco de estresse local (GOTTLIEB; BONARDI; MORIGUCHI, 2005; ROBBINS *et al.*, 2008).

O LDL oxidado também estimula a liberação de fatores de crescimento, citocinas e quimiocinas pelas CE e pelos macrófagos, aumentando o recrutamento de monócitos e plaquetas para as lesões e, conseqüentemente, a quantidade de ROS, a oxidação do LDL e a quantidade e tamanho dos trombos. As citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento liberados também estimulam a migração para

a íntima das VSMC da camada média, dos precursores circulantes de VSMC e de fibroblastos da camada adventícia (ROBBINS *et al.*, 2008).

Os lipídios em excesso serão incorporados aos macrófagos através de um receptor *scavenger*, resultando na formação de muitas células espumosas, que caracterizam uma estria gordurosa. Estas estrias não elevam significativamente a parede do vaso, não afetando o fluxo sanguíneo e não irão, necessariamente, progredir para formar lesões ateroscleróticas avançadas (LIBBY; THEROUX, 2005; ROBBINS *et al.*, 2008).

A Figura 2 mostra as interações citadas acima de forma esquemática.

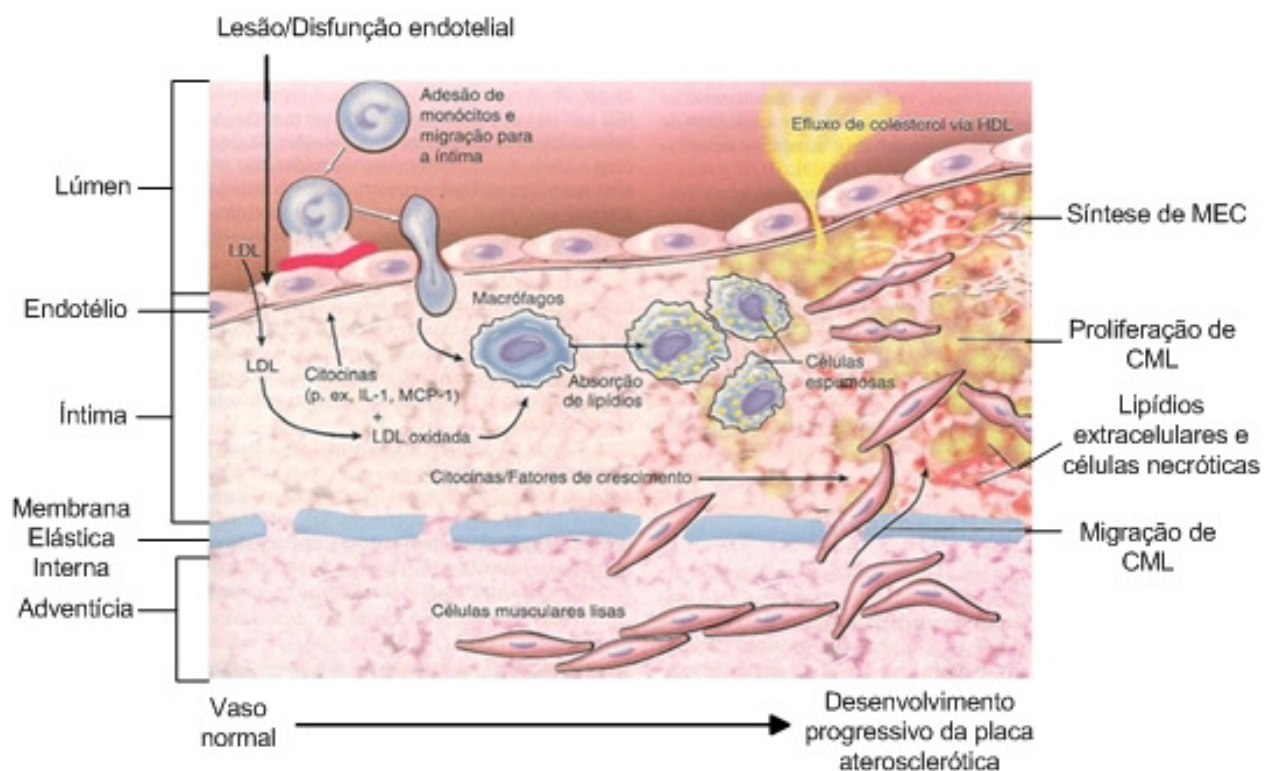


FIGURA 2 – DIAGRAMA ESQUEMÁTICO DA SEQUÊNCIA DE INTERAÇÕES QUE OCORREM NA LESÃO INICIAL DA ATEROSCLEROSE

FONTE: Adaptado de Robbins *et al.* (2005).

Juntamente com os monócitos, são recrutados também linfócitos T e neutrófilos, que são ativados na íntima – não se sabe ao certo por qual fator, se constituintes da parede arterial modificados, lipoproteínas, antígenos virais ou bacterianos – e geram um estado inflamatório crônico, em que são liberadas citocinas inflamatórias que estimulam macrófagos e CE. As CE estimuladas liberam fatores de crescimento que também induzem as VSMC, agora na íntima, a se proliferarem e a produzirem MEC (GOTTLIEB; BONARDI; MORIGUCHI, 2005; ROBBINS *et al.*, 2008).

A proliferação das VSMC e a produção de MEC, principalmente de colágeno, estabilizam a placa aterosclerótica ao formar uma capa fibrosa e transformam a estria gordurosa em um ateroma maduro, que se sobressai no lúmen geralmente em posições excêntricas e altera o fluxo sanguíneo (Figura 3). No entanto, as células inflamatórias ativadas (macrófagos, linfócitos T) ficam presas ao ateroma e passam a causar apoptose às VSMC da íntima (formando um centro necrótico) e a catabolizar a MEC produzida, causando instabilidade à placa (LIBBY; THEROUX, 2005; ROBBINS *et al.*, 2008).

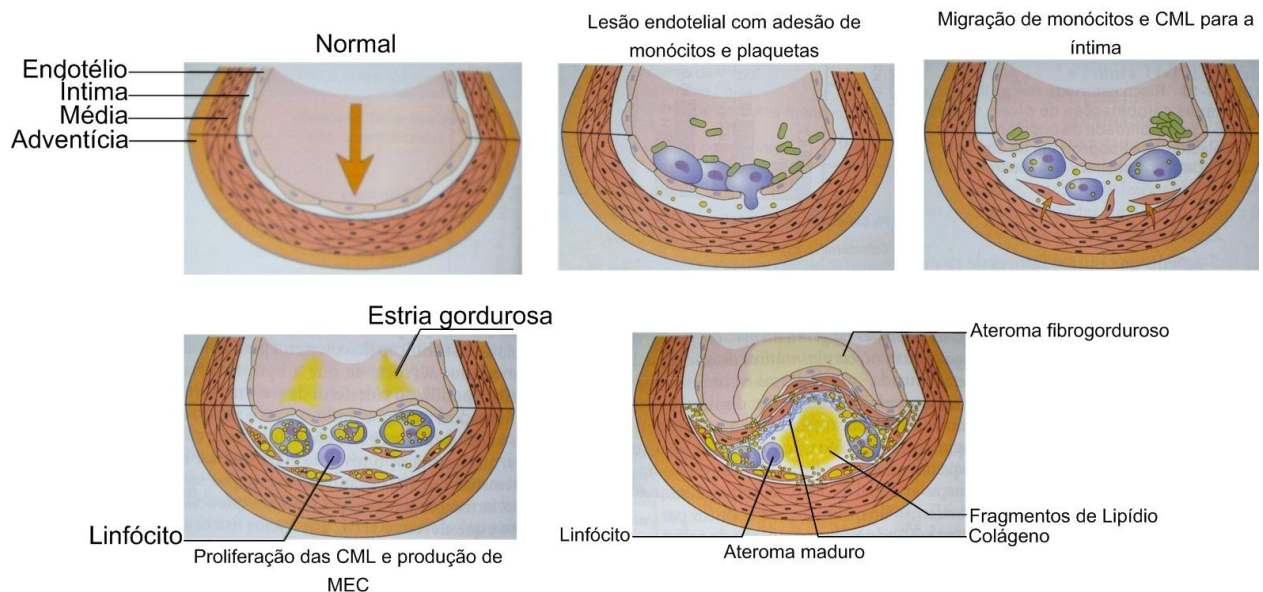


FIGURA 3 – EVOLUÇÃO DAS ALTERAÇÕES NA PAREDE ARTERIAL NA HIPÓTESE DA RESPOSTA A LESÃO

FONTE: Adaptado de Robbins *et al.* (2005).

O centro necrótico contém: lipídios (colesterol e ésteres de colesterol); restos de células mortas; células espumosas (macrófagos com lipídios e VSMC interiorizados); fibrina; trombos organizados de várias formas e outras proteínas plasmáticas (Figura 4). Ateromas típicos contêm abundância de lipídios, mas em algumas placas o conteúdo é quase exclusivamente formado por VSMC e tecido fibroso (GOTTLIEB; BONARDI; MORIGUCHI, 2005; ROBBINS *et al.*, 2008).

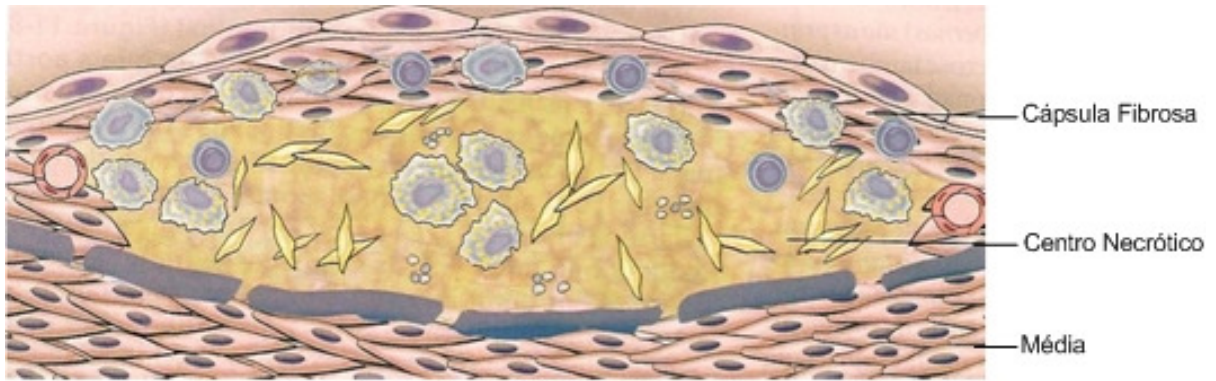


FIGURA 4 – PRINCIPAIS COMPONENTES DE UM ATEROMA TÍPICO, SOBREJACENTE A UMA MÉDIA INTACTA

FONTE: Adaptado de Robbins *et al.* (2005).

A placa continua a se desenvolver pela contínua morte celular, degeneração e remodelagem de MEC, deposição de trombos, formação periférica de neovasculatura e calcificação. As complicações, segundo Robbins *et al.* (2008), podem variar entre:

- a) ruptura, ulceração ou erosão da superfície do lúmen, expondo o fluxo sanguíneo a substâncias altamente trombogênicas, levando à formação de trombos que podem causar isquemia ou se incorporar a placas em formação;
- b) hemorragia no interior da placa devido à ruptura da capa fibrosa ou da área de neovascularização, dando origem a um hematoma contido que pode causar a expansão ou ruptura desta;
- c) ateroembolismo, em que restos da ruptura de uma placa são carregados pela corrente sanguínea, produzindo microêmbolos;
- d) formação de aneurisma, devido à pressão induzida pela placa e à perda de elasticidade, causando a fraqueza da parede vascular que pode, então, se romper.

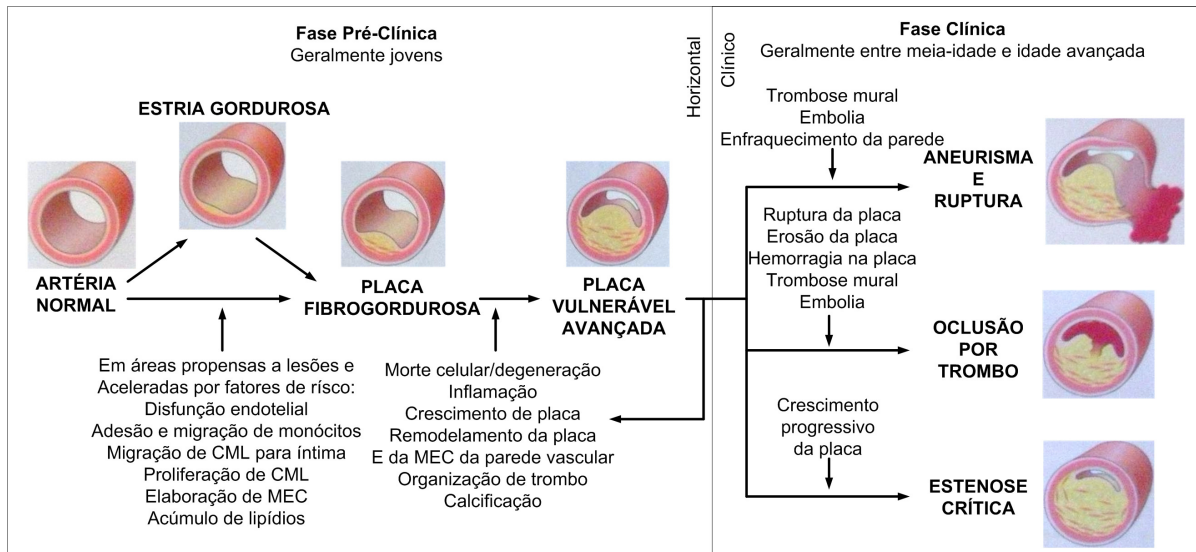


FIGURA 5 – OS PRINCIPAIS EVENTOS PATOGENÉTICOS E AS COMPLICAÇÕES CLÍNICAS DA ATEROSCLEROSE

FONTE: Adaptado de Robbins *et al.* (2005).

3.4 ANGIOPLASTIA

Introduzida, em 1977, por Andreas Grüntzig, a angioplastia transluminal coronariana (ATC) foi inicialmente aplicada em pacientes com doença coronária sintomática de um único vaso e cuja obstrução se localizasse nos segmentos proximais da árvore coronária. É, na atualidade, um dos métodos mais importantes para o tratamento das lesões coronárias obstrutivas, incluindo a aterosclerose, com um índice de sucesso primário com lesão residual menor que 50% e de ausência de complicações maior que 90% (CARAMORI; YAMAMOTO; ZAGO, 1997).

A ATC realizada com cateter-balão se tornou o método mais utilizado, devido ao fato de ser um procedimento relativamente de baixo risco, pouco invasivo e com possibilidade de repetição. O acesso vascular segue os princípios técnicos descritos por Seldinger, em 1953, em que, em geral, o sítio de acesso mais próximo à lesão permite maior número de opções terapêuticas (PEREIRA; GRUDTNER, 2005).

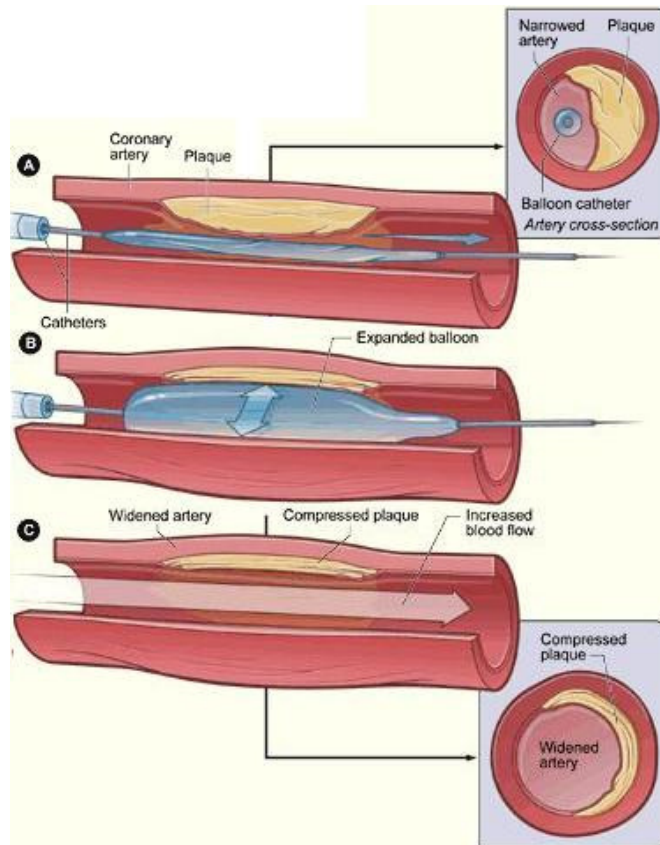


FIGURA 6 – ANGIOPLASTIA TRANSLUMINAL CORONARIANA POR CATETER-BALÃO

Em (A) a inserção do balão vazio na artéria obstruída; em (B) a insuflação do balão, comprimindo a placa e restaurando o tamanho do lúmen; em (C) a artéria distendida, a placa comprimida e o fluxo sanguíneo restabelecido.

FONTE: Adaptado de NHLBI (2010).

Primariamente, espera-se que a dilatação do balão reestabeleça o fluxo sanguíneo adequado através do aumento do diâmetro do lúmen. Mas, segundo Pereira e Grudtner (2005), a dilatação propriamente dita é, provavelmente, o efeito menos importante neste tipo de ATC. Ainda segundo os autores, atualmente dois mecanismos têm sido aceitos para explicar os efeitos da dilatação do balão na parede arterial e sua importância é altamente dependente do tipo de lesão a ser tratada:

- a) em lesões ateroscleróticas concêntricas se observa aumento luminal devido à fratura da placa e devido a um estiramento e afilamento das camadas média e adventícia;
- b) em lesões ateroscleróticas excêntricas se observa apenas o aumento luminal dependente do estiramento e afilamento das camadas média e adventícia, sem fratura da placa. Por esta razão, nestas lesões há um risco maior de ruptura arterial.

O grau de calcificação da placa, assim como o volume da placa formada também parece influenciar no modo com que a lesão responde à dilatação do balão. Placas muito calcificadas respondem menos à dilatação com balão e podem requerer maior pressão na insuflação do balão, e volumes muito grandes parecem diminuir os índices de sucesso da angioplastia com balão (PEREIRA; GRUDTNER, 2005).

A principal limitação da angioplastia com balão são as lesões oclusivas localizadas próximas a artérias aneurismáticas. A dilatação nessas circunstâncias é contraindicada pelo alto risco de ruptura arterial. Além desta, lesões que contêm trombo parcialmente organizado também são contraindicadas ao procedimento pelo risco de embolização periférica (PEREIRA; GRUDTNER, 2005; ROBBINS *et al.*, 2008).

Nas últimas duas décadas, porém, o desenvolvimento dos sistemas de guias e cateteres, associado à introdução de *stents* e de drogas antiplaquetárias potentes, ampliou a indicação do procedimento para situações anatômicas desfavoráveis. Além disso, diminuiu, mas ainda não tão significativamente, a incidência das complicações pós-operatórias, como a reestenose (PEREIRA; GRUDTNER, 2005).

Os *stents* ou fixadores endovasculares são próteses metálicas, desenvolvidas por Dotter, em 1969. São indicados para lesões ateroscleróticas obstrutivas, ou no caso de complicação pós ATC (CARAMORI; YAMAMOTO; ZAGO, 1997; PEREIRA; GRUDTNER, 2005).

A implantação desses fixadores consiste em liberar o *stent* no local através de um sistema de cateteres variável que dependem do tipo de *stent* utilizado (autoexpansível ou expansível por balão). Quando ocorre extravasamento no sítio alvo, tortuosidade severa do vaso e lesões muito calcificadas, a colocação dos *stents* é contraindicada. Atualmente, existe uma variedade de *stents* sob investigação, devido a sua composição (PEREIRA; GRUDTNER, 2005).

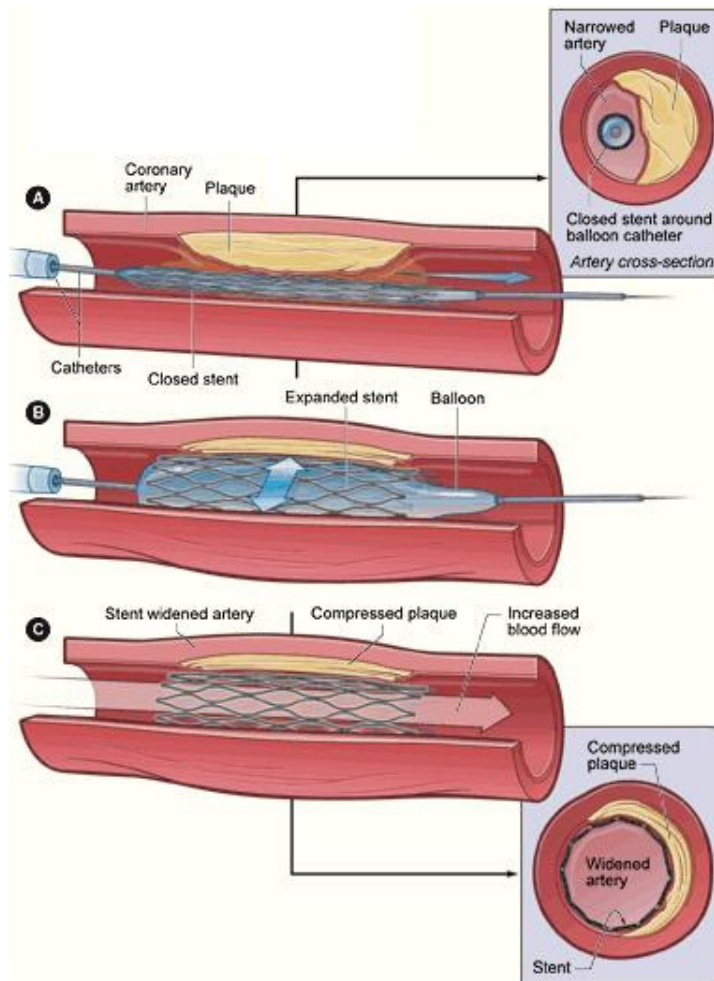


FIGURA 7 – ANGIOPLASTIA TRANSLUMINAL CORONARIANA POR CATETER-BALÃO COM A COLOCAÇÃO DE *STENT*

Em (A) a inserção do balão vazio envolvido pelo *stent* fechado; em (B) o balão é insuflado e o *stent* expandido, comprimindo a placa e restaurando o tamanho do lúmen; em (C) o *stent* distendendo a artéria, comprimindo a placa e restabelecendo o fluxo sanguíneo.

FONTE: Adaptado de NHLBI (2010).

As complicações do procedimento incluem, além da reestenose (complicação cirúrgica mais frequente, ocorrendo em 20 a 40% das obstruções inicialmente dilatadas com sucesso), as decorrentes do *stent* propriamente dito: migração, trombose, expansão inadequada ou ausência de expansão e ruptura arterial (CARAMORI; YAMAMOTO; ZAGO, 1997; PEREIRA; GRUDTNER, 2005).

3.5 REESTENOSE

A reestenose desenvolve-se, fundamentalmente, nos primeiros meses após a angioplastia, tendo o pico de incidência em humanos entre o 3º e o 6º mês após o procedimento. O critério utilizado para defini-la nem sempre utiliza a evolução clínica

do paciente e não existe um consenso sobre qual seja a melhor definição. Pela avaliação visual, o aumento da lesão residual maior que 50% indicaria reestenose (LUZ; SOLIMENE, 1997).

Gershlick *et al.* (1993, *apud* LUZ; SOLIMENE, 1997) utilizaram as quatro definições mais aceitas, em 135 pacientes submetidos à ATC, para verificar qual delas se correlaciona melhor com a evolução clínica. A partir daí, a reestenose foi definida clinicamente pela necessidade de internação hospitalar por angina instável recorrente e pela presença de teste de esforço positivo após seis meses de evolução.

É caracterizada como uma resposta fibroproliferativa à lesão ocasionada pela insuflação do cateter-balão, sendo o principal elemento a formação de uma camada neoíntima que, histologicamente difere significativamente da placa aterosclerótica, quanto à arquitetura celular e ao conteúdo lipídico. A reestenose segue uma sequência de eventos celulares, que podem ser divididos em três fases, embora essas fases não possam ser completamente individualizadas (LUZ; SOLIMENE, 1997; POLLMAN; HALL; GIBBONS, 1999; WALSH; SMITH; KIM, 2000).

Na primeira fase, a lesão vascular ocasionada pela ATC promove fratura e compressão da placa aterosclerótica, desnudação endotelial, rompimento da neoíntima aterosclerótica e da lâmina elástica interna e induz rápida e, relativamente, sincronizada apoptose das VSMC da camada média. A maciça perda endotelial torna a superfície do vaso altamente trombogênica, suscetível à interação de plaquetas e trombina, que liberam mediadores trombóticos, inflamatórios e substâncias vasoativas, como tromboxano, serotonina, fatores de crescimento derivados de plaquetas (PDGF), epidérmico (EGF), fibroblástico (FGF) e transformador beta (TGF β) (LUZ; SOLIMENE, 1997). Além disso, a ruptura endotelial e a morte das VSMC desestruturam todos os segmentos da parede do vaso tornando facilitada a dilatação da camada adventícia. Essa dilatação ocorre como resposta à progressão do estiramento resultante da hiperplasia da íntima (WALSH; SMITH; KIM, 2000).

Na segunda fase, algumas enzimas da cascata de coagulação ativam a expressão de oncogenes, que são detectados como marcadores da ativação das VSMC. A expressão desses genes está associada com a entrada das VSMC no ciclo celular, o que indica o início de sua intensa proliferação (evidente 24 horas após a lesão e diminuída, porém contínua, por cerca de 2 semanas). A utilização de

oligonucleotídeos *antisense* para inibir o desenvolvimento da neoíntima sugere que a inibição da expressão desses genes durante essas fases iniciais pode afetar significativamente a cascata de eventos que leva a hiperplasia da íntima algumas semanas depois (BAUTERS; ISNER, 1997).

As VSMC, juntamente com fibroblastos ativados da camada adventícia, migram para a íntima através de poros na membrana elástica interna. Na terceira fase – a fase tardia de estabilização – as VSMC, agora na íntima, sofrem proliferação e apoptose residual aparentemente em taxas semelhantes, o que limita o tamanho da neoíntima formada, e uma drástica modificação fenotípica, em que passam de células contráteis para células de secreção de MEC. Juntamente com fibroblastos, essas VSMC modificadas produzem proteoglicanos (sulfato de condroitina, dermatan-sulfato e heparan-sulfato), fibronectina, colágeno e fibras de elastina, que modulam a MEC adjacente e remodelam os vasos. A resposta inflamatória à lesão também promove a remodelação por meio da liberação de enzimas proteolíticas. (LUZ; SOLIMENE, 1997; BAUTERS; ISNER, 1997).

Estima-se que a primeira fase dure de minutos a horas. A segunda fase, em que há redução progressiva no número de plaquetas depositadas e início da reendotelização, de dois dias a semanas. E a terceira fase, quando o desenvolvimento da neoíntima fibrosa fica significativamente maior e mais uniforme, cerca de 14 dias, tendendo a se estabilizar após 30 ou 60 dias, mas podendo continuar a crescer durante meses em humanos. A espessura da neoíntima pode se igualar à da camada média, ou mesmo ultrapassá-la (LUZ; SOLIMENE, 1997). O estudo de tais fenômenos tem avançado bastante graças ao modelo experimental de lesão arterial por cateter-balão em diversos modelos animais. Em coelhos normais submetidos à lesão arterial por cateter-balão, a região da íntima, de uma estrutura praticamente linear situada logo abaixo do endotélio, atingiu aproximadamente cinco vezes a espessura da camada muscular lisa (BAUTERS; ISNER, 1997).

Atualmente, os principais fatores estudados envolvidos no processo de reestenose são:

- a) a remodelação arterial, descrita como mudança na área total do vaso ou na área circunscrita pela lâmina elástica interna (LUZ; SOLIMENE, 1997);
- b) a morte celular em massa, a migração, a multiplicação e a mudança fenotípica das VSMC, dependente, principalmente da perda de

funcionalidade de diversas proteínas de membrana da família das integrinas e da ativação de processos *redox* (WALSH; SMITH; KIM, 2000; ZARGHAM; THIBAUT, 2005).

A remodelação arterial humana foi bem descrita por Glagov *et al.* (1987, *apud* LUZ; SOLIMENE, 1997). Esses autores observaram em necropsias humanas um alargamento adaptativo do tronco da coronária esquerda em resposta à expansão progressiva da placa reestenótica. Esse alargamento ocorreria no sentido externo do vaso e manteria a área luminal aberta, mesmo com placas ocupando 40% da área. Caso ocorresse um alargamento compensatório do vaso que acomode uma quantidade significativa de neoíntima, a área luminal é preservada. Por outro lado, a vasoconstrição crônica, mesmo associada a pouca formação de neoíntima poderia também contribuir decisivamente para a formação de reestenose.

Kakuta *et al.* (1994, *apud* LUZ; SOLIMENE, 1997) verificaram experimentalmente que, após a angioplastia em artéria ilíaca de coelho, a área circunscrita pela lâmina elástica interna, quando comparada à medida imediata, aumentava 20% após quatro semanas. Esse aumento compensatório do vaso acomodava 60% da neoíntima formada e limitava o estreitamento do lúmen. Nos animais com e sem reestenose, o que diferia não era a área da íntima e, sim, a maior área de lâmina elástica interna encontrada naqueles sem reestenose. Nos animais com reestenose, para um determinado aumento na área da íntima, havia um menor aumento de lâmina elástica interna, sugerindo a existência de um alargamento compensatório inadequado.

O papel da remodelação arterial após o implante de *stents* não está determinado. A reação vascular com *stent* parece seguir um curso de eventos um pouco diferente da reação sem a presença do *stent*, visto que eles diminuem o remodelamento, mas parecem servir de nicho específico para a hiperplasia da íntima (CARAMORI; YAMAMOTO; ZAGO, 1997; WARD *et al.*, 2000).

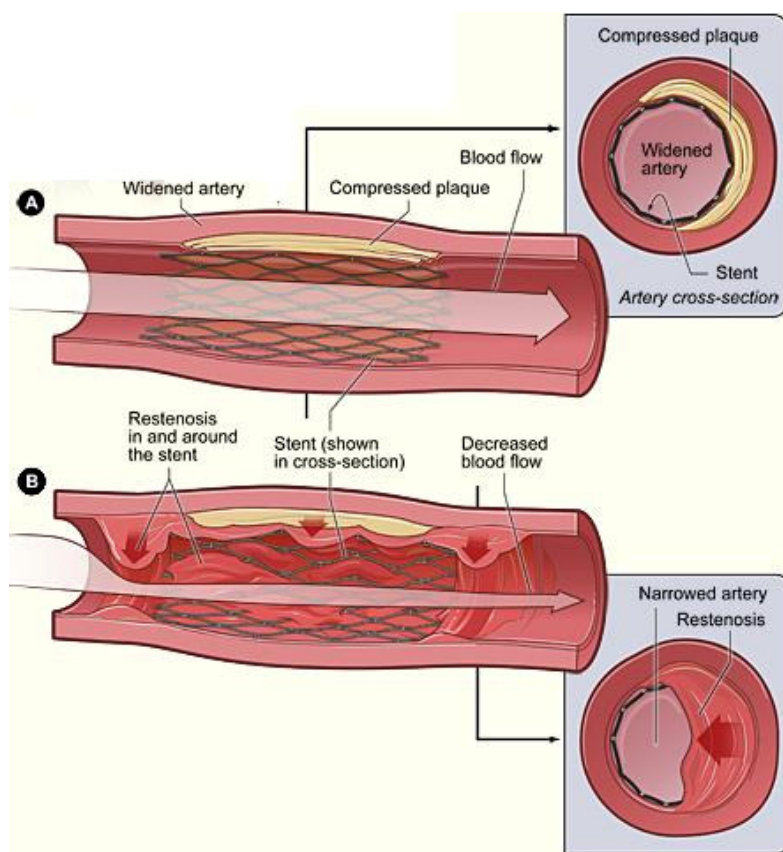


FIGURA 8 – REESTENOSE COM A PRESENÇA DE *STENT*

Em (A) a compressão da placa pelo *stent* numa artéria distendida; em (B) o crescimento de tecido de cicatrização pelo *stent* e ao redor dele, causando fluxo sanguíneo turbulento no local.

FONTE: Adaptado de NHLBI (2010).

Na grande maioria, os estudos tiveram como objetivo a prevenção da reestenose através da inibição da hiperplasia neointimal ou de processos trombóticos e não procuraram intervir no processo de remodelação, o que pode justificar resultados improdutíveis (LUZ; SOLIMENE, 1997).

As VSMC são objetos de estudo por vários motivos. Primariamente, muitos estudos demonstram que existem duas ondas de apoptose das VSMC. A primeira ocorre logo após o procedimento, devido a indução rápida e sincronizada de sinais pró-apoptóticos e ocasiona perda maciça na densidade celular da camada média horas após a injúria. Ainda que as consequências dessa apoptose precoce na média sejam desconhecidas, ela pode estar relacionada a um posterior aumento excessivo da neoíntima, por ocasionar uma resposta exagerada para compensar a grande perda populacional. A segunda onda de apoptose ocorre dias ou semanas após a lesão e é menos prejudicial ao tecido, visto que ocorre apenas com as VSMC confinadas na neoíntima. Considerando que a proliferação das VSMC continua por semanas, mas a neoíntima atinge seu máximo desenvolvimento em

aproximadamente duas semanas (em artérias carótidas de ratos), assume-se que as taxas de multiplicação e de apoptose se equilibrem, limitando o crescimento (WALSH, SMITH, KIM, 2000).

A migração das VSMC também apresenta desafios, pois não se sabe ao certo a origem das VSMC que migram para formar a neoíntima. Parece haver três possibilidades básicas de origem: desdiferenciação e migração das VSMC contráteis da camada média para a íntima; multiplicação das populações celulares oriundas das três camadas (íntima e adventícia eventualmente podem possuir alguma quantidade de VSMC); ou multiplicação e diferenciação de células pluripotentes oriundas do sangue periférico – em geral células progenitoras hematopoiéticas ou progenitoras endoteliais (THIESEN, 2007).

A migração em si parece se confundir com o evento de multiplicação. Segundo Clowes e Schwartz (1985), a multiplicação e a migração são eventos distintos visto que para se multiplicar as VSMC necessitam de indução por fatores diversos, incluindo PDGF, EGF e FGF e para migrar, elas necessitam sofrer indução apenas de PDGF. Assim, mesmo que a superfície lesada possua os diversos fatores que induzem a multiplicação, eventualmente as VSMC podem proliferar e migrar, ou apenas migrar, evidenciado pela presença de VSMC que nunca sofreram proliferação na íntima.

Segundo Zargham e Thibault (2005), a mudança do fenótipo diferenciado (contrátil), para um desdiferenciado (proliferativo), ocorre devido a alterações nos receptores de adesão - proteína de membrana da família das integrinas – que promovem a interação entre o citoesqueleto e a MEC, induzidas pela presença dos fatores trombogênicos. É bastante evidenciado que essas interações regulam a progressão do ciclo celular, devido a interação do citoesqueleto com fibras de estresse (ZARGHAM; WAMHOFF; THIBAUT, 2007).

Atualmente, o processo de migração, a multiplicação e drástica mudança fenotípica das VSMC são descritos como dependentes de processos *redox* e se comumente se confunde com os processos ocorridos em fibroblastos ativados da adventícia (THIESEN, 2007; MARTÍN; GRIENDLING, 2010).

3.5.1 Processos *redox*

Entre os principais aspectos da reparação vascular e dos contribuintes para reestenose, aqueles envolvendo processos *redox* têm se tornado cada vez mais evidentes (POLLMAN; HALL; GIBBONS, 1999). Estes processos estão relacionados à formação enzimática de ROS e determinam o ambiente *redox* celular. Organelas e microambientes celulares são os principais contribuintes para a modulação desse sistema de transferência de elétrons (THIESEN, 2007).

ROS é um nome comum dado a um grupo heterogêneo de pequenas moléculas reativas, primariamente conhecidas pela importância na oxidação de lipídios, proteínas e DNA. Elas incluem espécies reativas de oxigênio, caracterizadas como radicais livres (O_2^-) ou não (H_2O_2), que modificam o microambiente celular e o estado de oxidação de proteínas específicas. Como já citado, uma consequência importante da geração de radicais superóxido é a diminuição dos níveis de NO, que ocasiona disfunção vascular. Já o H_2O_2 , apesar de ser o tipo de ROS mais estável, tem uma grande capacidade de oxidação, baseado em seu potencial redutor (MARTÍN; GRIENDLING, 2010).

As fontes enzimáticas de ROS em vasos incluem: a NAD(P)H oxidase; a cadeia respiratória mitocondrial; a xantina oxidase; a lipoxigenase e a óxido nítrico sintase desacoplada. E as principais fontes em VSMC são a NAD(P)H oxidase e a cadeia respiratória mitocondrial (THIESEN, 2007; MARTÍN; GRIENDLING, 2010).

A *Non-Phagocytic* NAD(P)H oxidase (Nox) é um complexo multiprotéico. Presente em diferentes tipos celulares, sua composição e sua função parecem ser distintas em cada tipo celular (WEINTRAUB, 2002). A primeira oxidase descrita, a *Phagocytic* NAD(P)H oxidase (Phox), é um complexo enzimático, cuja ativação envolve a interação de várias subunidades protéicas, que se encontram espalhadas no citosol, na membrana celular e nas membranas dos grânulos de secreção. Esse complexo amplifica a transferência de elétrons do substrato NAD(P)H para o oxigênio molecular, gerando altos níveis de O_2^- , produto primário da Nox. Diferentemente da Phox, que necessita de ativação, a oxidase de células vasculares tem atividade constitutiva, com função de produzir pequenas quantidades de ROS que modulam a sinalização celular de processos como migração, proliferação, diferenciação, regulação da expressão e da atividade de metaloproteases da matriz,

secreção de citocinas inflamatórias, hipertrofia e apoptose. Esses processos estão relacionados com condições fisiológicas normais e patológicas (THIESEN, 2007).

Na reestenose, logo após a lesão, ocorre maciça produção de superóxido devido à ativação da Nox vascular modulada por sinais extracelulares incertos. Esse processo leva à ativação de fatores de transcrição – associados às respostas inflamatória e cicatricial –, redução da atividade da superóxido dismutase (SOD) – fator-chave para o remodelamento constritivo do vaso – e estresse oxidativo. O estresse após a lesão pode ser confirmado pela redução dos níveis celulares de glutathione reduzida e aumento da oxidada (SHI *et al.*, 2001; SOUZA *et al.*, 2001).

Recentemente foi demonstrado que a Nox vascular é fortemente regulada por reagentes específicos de grupos tiol via mecanismos não diretamente relacionados ao estado *redox* da glutathione intracelular (AZEVEDO *et al.*, 2000). Assim, além de ROS, grupos sulfidril (tióis) reativos, protéicos e não-protéicos parecem participar efetivamente dos processos *redox* envolvidos na reparação vascular. Duas tiol-oxidoreduções que se destacam são a tioredoxina (Trx) e a proteína dissulfeto isomerase (PDI) (MUSTACICH; POWIS, 2000; HUANG *et al.*, 2001).

PDI é uma proteína com multidomínios abundante na célula com comportamento *redox* variável e conhecida interação com outras proteínas. Está localizada principalmente no retículo endoplasmático, onde promove o dobramento oxidativo de outras proteínas através de reações de oxidação, redução e isomerização. Janiszewski *et al.* (2005 *apud* THIESEN, 2007) mostraram uma associação física e funcional entre PDI e Nox em VSMC. No trabalho, um oligodeoxinucleotídeo *antisense* contra PDI promoveu redução de sua atividade e da atividade da Nox também. Por esse trabalho, pode-se propor que Nox pode ser regulado por PDI, apesar de PDI precisar da atividade de Nox para se tornar ativa, caracterizando uma estreita relação entre essas enzimas.

Trx, cuja expressão está aumentada em diversos tipos de estresse, destaca-se devido à sua expressão aumentada em placas ateroscleróticas e na neoíntima de artérias carótidas de rato lesadas por cateter-balão, entre 2 e 6 semanas pós-lesão, acompanhando o aumento na expressão de NOS (Óxido Nítrico Sintase) (MUSTACICH; POWIS, 2000; HUANG *et al.*, 2001). Essa enzima, juntamente com as tioredoxina redutase (TrxRs) responsáveis por reduzir Trx oxidadas, sugerem que tiol-oxidoreduções representam uma família de enzimas que podem modular

significativamente vários processos celulares *redox*, bem como mecanismos de produção de espécies reativas associados a disfunções na vasculatura.

3.5.1.1 QSOX1

Uma nova proteína pertencente à superfamília das tioredoxinas, a Quiescência/Sulfidril Oxidase (QSOX), foi localizada em fibroblastos de pulmão humano (COPPOCK *et al.*, 1993), clara de ovo de galinha (HOOBER *et al.*, 1996), trato genital masculino de rato e boi (OSTROWSKI; KISTLER, 1980; BENAYOUN *et al.*, 2001), endométrio de cobaia (MUSARD *et al.*, 2001), tecidos secretores humanos e sistema nervoso (TURY *et al.*, 2004; RADOM *et al.*, 2006). E, também foram descritas sua presença e atividade em soro fetal (ZANATA *et al.*, 2005).

Estruturalmente, as QSOXs são compostas pelo domínio homólogo PDI/TRX e pelo domínio homólogo Erv/Alr. Este arranjo de domínios foi reconhecido em QSOX com expressão aumentada em fibroblastos humanos em quiescência (COPPOCK *et al.*, 1993). Como descrito anteriormente, PDI e Trx são tiol-oxidorreduções bastante importantes na manutenção da homeostase *redox*. Erv (Essencial for respiration and vegetative growth) é uma pequena proteína de levedura, cuja proteína homóloga em humano é a ALR (Augmenter of Liver Regeneration). Trabalhos recentes têm demonstrado o papel essencial de Erv no processo de importação de proteínas mitocondriais específicas e ALR sendo um fator de crescimento que estimula a proliferação de hepatócitos para a regeneração do tecido hepático. Ambas possuem atividade sulfidril oxidase e é o domínio C-terminal Erv/Alr que possui o sítio *redox* ativo na QSOX (LEE; HOFHAUS; LISOWSKY, 2000; THORPE *et al.*, 2002; CHEN *et al.*, 2003).

As sequências QSOX iniciam com uma sequência sinal, consistente com a localização no interior do retículo endoplasmático. Em seguida, aparece o domínio tioredoxina contendo o motivo *redox* ativo CXXC. Após uma região espaçadora de aproximadamente 270 aa, inicia-se o domínio Erv/Alr, responsável pela catálise nas enzimas QSOX. Seguindo o domínio inicia-se a região C-terminal altamente variável de aproximadamente 200 aa, que termina com uma região transmembrana (HECKLER *et al.*, 2008). Em mamíferos, dois mRNA codificam proteínas distintas, com um sítio de *splicing* alternativo: QSOX1 (a mais abundante) e QSOX2 ou

QSOXN, caracterizada inicialmente em células de neuroblastoma, em que foi demonstrada ação pró-apoptótica (WITTKE *et al.*, 2003).



FIGURA 9 – ESTRUTURA DO GENE QSOX EM MAMÍFEROS

Próxima à região N terminal uma região sinalizadora, seguida de dois domínios Trx, um espaço intragênico, o domínio Erv/ALR e uma região C terminal que codifica uma região transmembrana.

FONTE: Adaptado de THORPE e COPPOCK (2007).

A reação catalisada pela QSOX é a oxidação de 2 tióis produzindo uma ligação dissulfeto à custa da redução do oxigênio molecular a peróxido de hidrogênio (THORPE; COPPOCK, 2007).

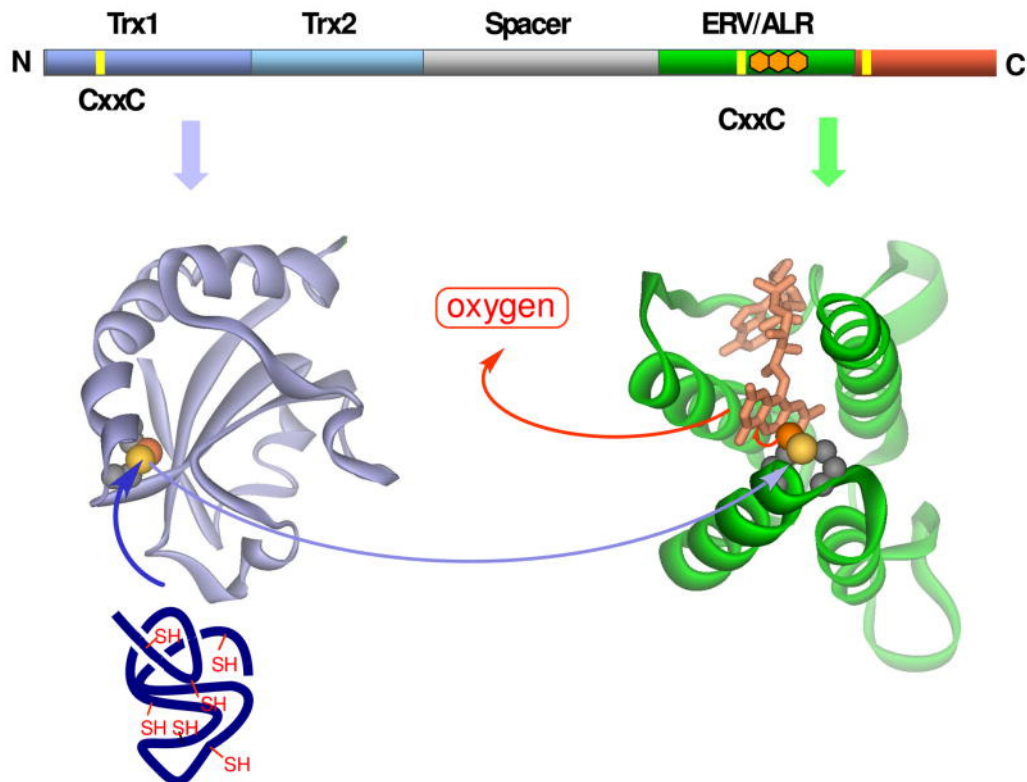


FIGURA 10 – REPRESENTAÇÃO TRIDIMENSIONAL DA PROTEÍNA QSOX MONOMÉRICA

Modelo homólogo aos domínios Trx1 e Erv/ALR construídos utilizando estruturas cristalinas de levedura PDI1, domínio [59] e Erv2p, domínio [29], respectivamente. A superfície acessível e os átomos de enxofre estão representados pelas esferas amarelas e laranjas, respectivamente.

FONTE: Adaptado de HECKLER *et al.* (2008).

Apesar destes dados, a função da QSOX permanece desconhecida. Sua expressão aumentada quando fibroblastos entram em quiescência proliferativa celular, assim como seu destino extracelular, sugerem um papel no dobramento

correto de proteínas extracelulares envolvidas no controle da modulação fenotípica celular. A cooperação entre PDI purificada e QSOX de clara de ovo foi demonstrada *in vitro* por Hooper *et al.* (1996), e mostrou-se importante para o dobramento correto de proteínas. Também foi demonstrado por Nakao, Pedro e Laurindo (2004), que micropartículas plasmáticas de portadores de doenças arteriais coronarianas apresentava um conteúdo maior de QSOX quando comparado aos de voluntários saudáveis (COPPOCK *et al.*, 1993; THORPE *et al.*, 2002).

Assim, como existem bastantes evidências de que os mecanismos envolvidos no processo de reestenose são influenciados por processos *redox* (AZEVEDO *et al.*, 2000), torna-se bastante interessante avaliar a expressão da QSOX através de imuno-histoquímica em carótidas de ratos que sofreram injúria pelo modelo experimental de lesão arterial por cateter-balão, a fim de obter mais recursos para discutir seu papel biológico.

3.5.2 Fibronectina

Fibronectina é uma proteína da MEC, que em geral apresenta-se na forma de um dímero com subunidades muito semelhantes, com peso molecular de aproximadamente 230-250 kDa cada e elas são ligadas covalentemente pelas porções C-terminais através de um par de pontes dissulfeto. Cada monômero consiste em três tipos de unidades repetitivas denominadas repetições FN. O tipo I contém doze repetições, cada uma formada por 40 resíduos de aminoácidos (aa); o tipo II contém duas repetições e inclui aproximadamente 60 aa; e o tipo III contém de 15 a 17 repetições e aproximadamente 90 aa. Todas as três são compostas por duas folhas- β antiparalelas, sendo os tipos I e II estabilizadas por pontes dissulfeto. O tipo III, por não possuir pontes dissulfeto que estabilizem suas folhas- β , permite que esse domínio sofra conformação quando aplicada determinada força. Juntas, elas compõem aproximadamente 90% da sequência de FN. O tipo III pode estar presente na FN celular, mas nunca está presente na FN plasmática. Ele possui uma região V variável que contém o sítio de ligação para integrinas, que está presente na maioria da FN celulares, mas em apenas um dos dímeros das FN plasmáticas (PANKOV;YAMADA, 2002; MAO; WIERZBICKA-PATYNOWSKI; SCHWARZBAUER, 2003; MAO; SCHWARZBAUER, 2005).

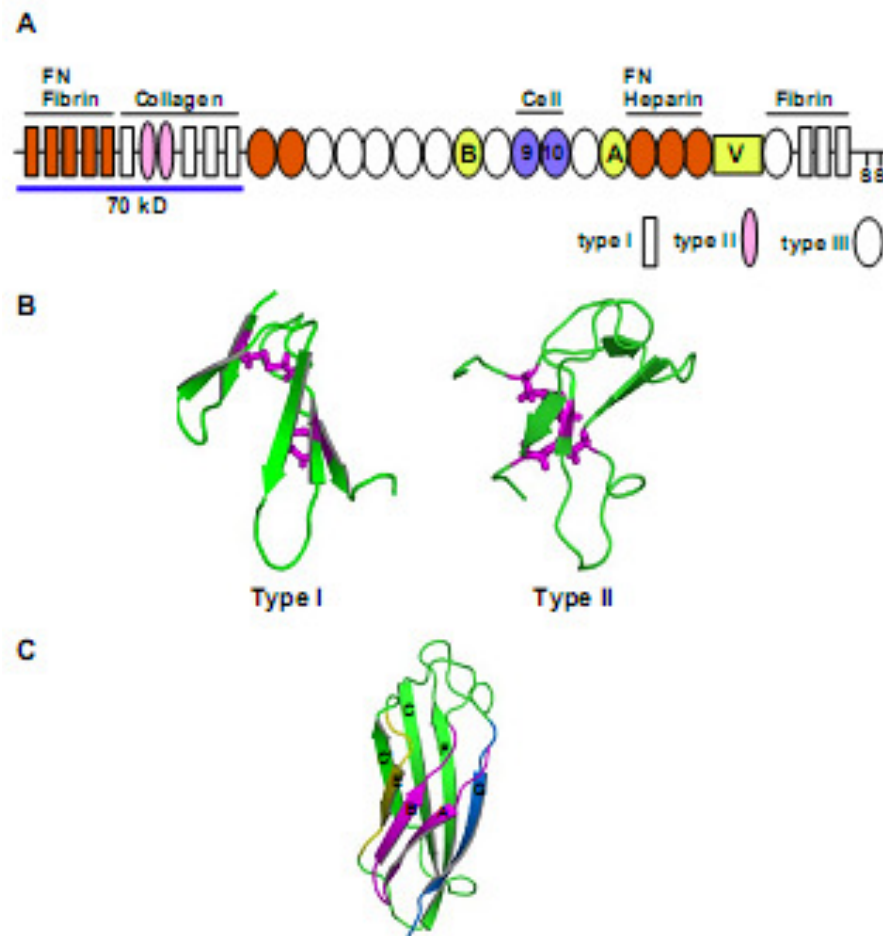


FIGURA 11 – ESTRUTURA MODULAR DA FN

Em (A) estão indicados os domínios para fibrina, colágeno, células e heparina, além de um par de Cisteínas na porção C terminal, que indica a forma dimérica; em (B) o tipo I e o tipo II foram desenhados com coordenadas a partir de resíduos 63-107, PDB ID1QGB (Potts *et al.*, 1999) e de resíduos 10-60, PDB 2FN2 (Pickford *et al.*, 1997), respectivamente; em (C) a estrutura da fita de FN humana tipo III foi elaborada com coordenadas a partir de resíduos 6-94, PDB ID 1FNA (Dickinson *et al.*, 1994b). Os resíduos de Cisteína e pontes dissulfeto são mostrados em roxo.

FONTE: Adaptado de MAO e SCHWARZBAUER (2005).

Segundo Patel *et al.* (1987, *apud* PANKOV; YAMADA, 2002), todas as três podem ser encontradas em outras moléculas, sugerindo que o gene para FN evoluiu através de um embaralhamento de éxons. Segundo Pankov e Yamada (2002), apesar de ser produto de um único gene, a proteína resultante pode existir em múltiplas formas através do *splicing* alternativo de um único pré-mRNA. Em humanos, FN pode ser encontrada em aproximadamente 20 variantes. Segundo esses mesmos autores, os variantes de FN podem ser caracterizados em duas isoformas em vertebrados:

- a) FN plasmática solúvel, formalmente chamada cold-insoluble Globulin – produzida no fígado pelos hepatócitos, é a principal proteína que compõe o plasma sanguíneo (300 µg/mL);
- b) FN celular insolúvel – é secretada por uma variedade de células (principalmente fibroblastos), sendo o principal componente da MEC. Primariamente secretada como um dímero solúvel sofre processos complexos mediado por células e componentes da MEC que a tornam insolúvel.

A presença de FN na MEC é determinante para adesão, migração, diferenciação e crescimento normal das células e é um importante componente dos processos de cicatrização e desenvolvimento embrionário. Sua montagem é complexa e sua expressão alterada está associada a diversas patologias, incluindo câncer e fibrose. FN possui domínios de ligação para outras FN, para Integrinas, para Fibrina, para Colágeno, para Fibulina, para Heparina e para proteoglicanos heparan-sulfato (Sindecan). FN celular insolúvel é montada na MEC por um processo complexo mediado por células e constitui uma rede de componentes insolúveis que suportam os órgãos e tecidos do organismo. Dessa forma, em qualquer corte histológico que contenha conjuntivo, FN estará presente (FARHADIAN *et al.*, 1996; WIERZBICKA-PATYNOWSKI; SCHWARZBAUER, 2003; CLAUSELL, 2005).

Durante a reestenose, os fibroblastos da camada adventícia são ativados por ROS e por outros fatores trombogênicos, como angiotensina II, e migram para a camada íntima. Na íntima, devido à lesão endotelial, eles passam a secretar metaloproteases, que degradam FN plasmática e outros agregados, e passam a secretar FN celular. A montagem do dímero se inicia quando os monômeros compactos e solúveis de FN, secretados pelos fibroblastos, ligam-se às Integrinas da superfície celular, formando um aglomerado. A grande concentração de FN ligadas às integrinas promove uma maior interação entre as moléculas de FN. Pequenas fibrilas de FN começam a se formar. A continuação desse processo e a exposição de sítios crípticos devido à extensão do monômero permite a formação da ligação FN-FN, formando fibras insolúveis estáveis que serão agregadas à MEC adjacente (FARHADIAN *et al.*, 1996; MAO; SCHWARZBAUER, 2005; CLAUSELL, 2005).

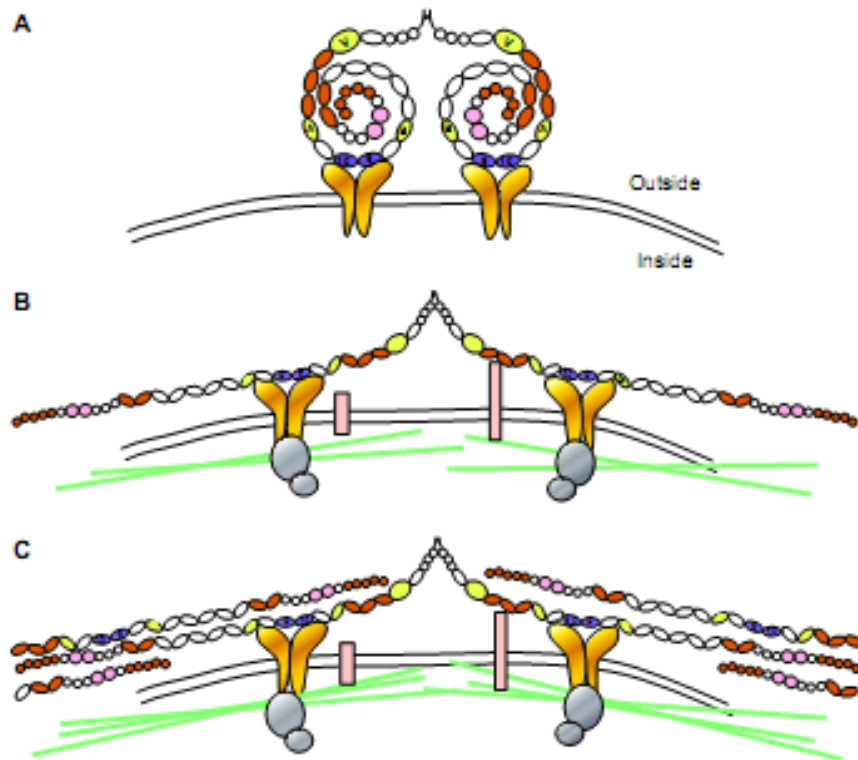


FIGURA 12 – PRINCIPAIS ETAPAS DA MONTAGEM DA FIBRA DE FN

Em (A) FN solúvel e compactada se liga a Integrina $\alpha 5 \beta 1$ através de seu domínio de ligação celular. A organização precisa das subunidades de FN solúvel sob a forma compactada não é conhecida, mas parece depender da interação intramolecular entre III2-3 e III12-14 e outros sítios de ligação de FN (Hynes, 1999; Johnson *et al.*, 1999). Em (B) a ligação de FN com Integrinas e outros receptores induz a reorganização da actina e ativa complexos de sinalização intracelular. A contratilidade celular provoca mudanças conformacionais em FN, que expõe domínios de ligação na molécula estendida. Em (C) fibrilas formadas através de interações FN-FN. O alinhamento das moléculas de FN pode variar dentro das fibrilas, pois depende da interação dos domínios.

FONTE: Adaptado de MAO e SCHWARZBAUER (2005).

O aumento de FN e diversas outras proteínas de MEC em tecidos vasculares lesados foi identificado em vários modelos animais, mas apenas em ratos o aumento significativo foi apenas de FN (FARHADIAN *et al.*, 1996).

3.6 MODELO ANIMAL

O modelo de lesão por cateter-balão em carótida de rato foi originalmente descrito por Clowes e colaboradores (1983) e, desde que empregado pela primeira vez, tornou-se abundantemente utilizado em pesquisas básicas e clínicas.

Metodologicamente, essa abordagem envolve o isolamento de um segmento da artéria carótida de um rato de laboratório previamente anestesiado, a realização de uma incisão na carótida externa por onde será inserido o cateter-balão, a

inserção no vaso até atingir a artéria carótida comum, a insuflação e desinsuflamento do balão repetidas vezes, para ocasionar desnudação endotelial e a distensão da parede vascular, a retirada do cateter, e o fechamento da incisão e retorno do fluxo sanguíneo à extensão do segmento isolado (TULIS, 2007).



FIGURA 13 – ANGIOPLASTIA COM CATETER-BALÃO EM RATOS

O posicionamento do animal, bem como o acesso à carótida esquerda através da abertura da região torácica com o fórceps.

FONTE: O autor (2010).

Pode-se adicionar à extensão da carótida lesada o Pluronic® Lecithin Organogel (P.L.O.), uma microemulsão lipossomal fosfolipídica, utilizada para a administração de fármacos via fluxo dérmico-epidérmico em que se deseja uma maior permeabilidade cutânea e um alcance sistêmico. Segundo a Embraparma (2010), em 1992, Williman *et al.*, relataram que o organogel de lecitina (PLO) interagiu com o estrato córneo na pele e desorganizava as camadas lipídicas, sem dissolvê-las como faz o DMSO, e concluíram que ele poderia ser uma forma de entrega transdérmica diferenciada e eficaz. Comumente chamado gel transdérmico, consiste de uma fase hidrossolúvel, gel aquoso de *polaxamer* 407 de 20 a 40%, e de uma fase lipossolúvel (L.I.P.S.), composta de uma solução de lecitina granulada e palmitato de isopropila, que devem sofrer uma força de extrusão necessária para a formação de micelas lipossomais que encapsulam o fármaco. Para aplicação de tal

força, pode-se utilizar duas seringas, uma delas já com o fármaco incorporado na solução L.I.P.S., conectadas por um adaptador que irá misturar seus conteúdos (EMBRAFARMA, 2010).

Nesse modelo o crescimento da íntima é máximo aproximadamente 14 dias após a lesão. Com aproximadamente 21 dias a lesão já está em processo de estabilização e, a partir de aproximadamente 28 dias, não se notam mais mudanças fenotípicas na lesão. Dessa forma, não é necessário manter os animais lesados vivos por mais de 2 meses, visto que a lesão não irá progredir nem regredir após o primeiro mês (TULIS, 2007).

O tecido coletado deve ser lavado para retirar restos sanguíneos, fixado para impedir que o tecido se deteriore e corado para que possa ser analisado posteriormente. Existem muitos compostos químicos que podem ser utilizados como substâncias fixadoras. Dentre elas, encontram-se os aldeídos (formaldeído, glutaraldeído e paraformaldeído), que são excelentes fixadores de proteínas, pois promovem uma ligação cruzada entre as cadeias polipeptídicas. Uma fixação mais prolongada pode diminuir a imunorreatividade do material e até causar resultado falso-negativo. A demora em colocar o tecido no formol ou a fixação de fragmentos muito grandes também pode ter o mesmo efeito, além de prejudicar a histopatologia devido à autólise (TIMM, 2005; GARCIA *et al.*, 2007).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 LESÃO ARTERIAL

A angioplastia com cateter-balão foi realizada na carótida esquerda de ratos machos Wistar (240-270g) como descrito por Clowes; Reidy e Clowes (1983). O procedimento cirúrgico foi realizado pelo mestrando Axel Helmut Rulf Cofré, que possui projeto aprovado no comitê de ética animal da UFPR, processo #412 (vide Anexo 1).

Os ratos foram anestesiados com injeção peritonial de ketamina (100 mg/kg) e xilazina (5 mg/kg) (MAFFIA *et al.*, 2006), e foi realizada tricotomia e a antisepsia com iodo-povidine da região cervical. A desnudação endotelial da carótida esquerda foi realizada com o cateter-balão de embolectomia (Fogarty 2F, Edwards Lifesciences).

O cateter foi introduzido através da artéria carótida externa até a artéria carótida comum, insuflado com 0,2 ml de solução fisiológica, arrastado com movimentos giratórios, desinsuflado e novamente posicionado na artéria carótida comum, insuflado, arrastado com movimentos giratórios e desinsuflado. Este procedimento se repetiu por três vezes e, então, a carótida externa foi ligada com fio *mononylon* 7.0 e sobre sua superfície foi adicionado gel plurônico.

A adição do gel foi feita, devido ao fato de esses experimentos iniciais serem os experimentos de controle de uma série que comporão o trabalho do mestrando Axel Cofré – que irão incorporar RNA de interferência nas carótidas lesadas através desse gel.

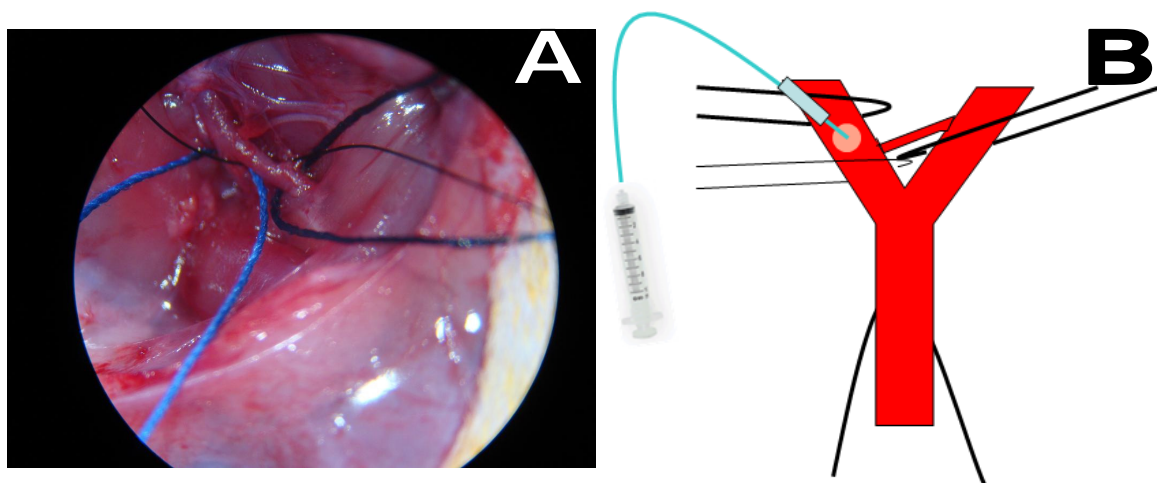


FIGURA 14 – DETALHE DA ANGIOPLASTIA TRANSLUMINAL CORONARIANA POR CATETER-BALÃO EM CARÓTIDA ESQUERDA DE RATOS WISTAR

Em (A) foto dos fios utilizados para impedir o fluxo de sangue pela carótida em que será inserido o cateter-balão. Em (B) desenho esquemático do acesso à região da carótida onde o balão será insuflado, além das amarras necessárias para cessar o fluxo sanguíneo dessa região.

FONTE: O autor (2010).

Um grupo de animais controle foram anestesiados e submetidos ao procedimento sem a utilização do balão (ratos sham-operados), mas com a aplicação de gel plurônico sobre a mesma extensão da carótida dos animais lesados. Os animais foram mantidos com água e ração *ad libitum* (JAGADEESHA *et al.*, 2005; TOUCHARD; SCHWARTZ, 2006).

A Tabela 1 mostra as informações sobre os ratos preparados pelo mestrando Axel Helmut Rulf Cofré.

TABELA 1 – INFORMAÇÕES SOBRE OS RATOS PREPARADOS PELO MESTRANDO AXEL HELMUT RULF COFRÉ

Intervalo	Lesão	Coleta	Peso (g)	
			Lesados	Sham
1 dia	10 de maio	11 de maio	240	255
			250	240
			255	
			265	
7 dias	5 de maio	12 de maio	240	260
			250	255
			245	267
14 dias	4 de maio	18 de maio	260	256
			240	
			243	257
21 dias	30 de abril	20 de maio	252	240
			237	

FONTE: O autor (2010).

4.2 PREPARAÇÃO DO TECIDO

Os ratos foram ortotansados com injeção peritoneal de tiopental (200 mg/kg) (CLOSE *et al.*, 1996) com 1, 7, 14 e 21 dias pós-lesão. (CLOWES; REIDY; CLOWES, 1983). As artérias lesadas foram coletadas em condições assépticas, lavadas em PBS (Solução Salina Tamponada com Fosfato) gelada e fixadas em paraformaldeído 4% overnight, desidratadas com diferentes concentrações de alcoóis e incluídas em Paraplast® (Ervplast) a 60°C por 3 horas, trocando o Paraplast® após a primeira 1,5 hora. Os cortes (5 µm e 7 µm) foram feitos em um micrótomo Leica e foram colocados em lâminas previamente revestidas com organossilano (Sigma), pois o processo inclui diversos banhos que podem, eventualmente, soltar o corte da lâmina.

4.3 COLORAÇÃO

Após fixação do tecido e inclusão em meio sólido (parafina), para cortes em micrótomo ou semissólido (O.C.T.), para cortes em criostato, deve-se corar o tecido com substâncias capazes de identificar os objetos da análise.

Os cortes foram corados com hematoxilina e eosina para análise das condições do tecido e para quantificar a proporção íntima-média. Esses cortes foram medidos utilizando-se o programa DS2 Olympus e, através de polígonos multipontos, foram obtidas três áreas denominadas ALúmen, AÍntima e AMédia que representam, respectivamente:

- a) a área ocupada pelo lúmen
- b) a área ocupada pela íntima mais a área ocupada pelo lúmen e
- c) a área da média somadas as áreas da íntima e do lúmen.



FIGURA 15 – POLÍGONOS MULTIPONTOS

AMédia – polígono mais externo, delimita a lâmina elástica externa; AÍntima – polígono mediano, delimita a lâmina elástica interna; ALúmen – polígono mais interno, delimita o lúmen da carótida.

FONTE: O autor (2010).

Portanto para encontrar a área da coroa circular referente à íntima, subtrai-se ALúmen de AÍntima e para encontrar a coroa circular referente à média, subtrai-se AÍntima de AMédia.

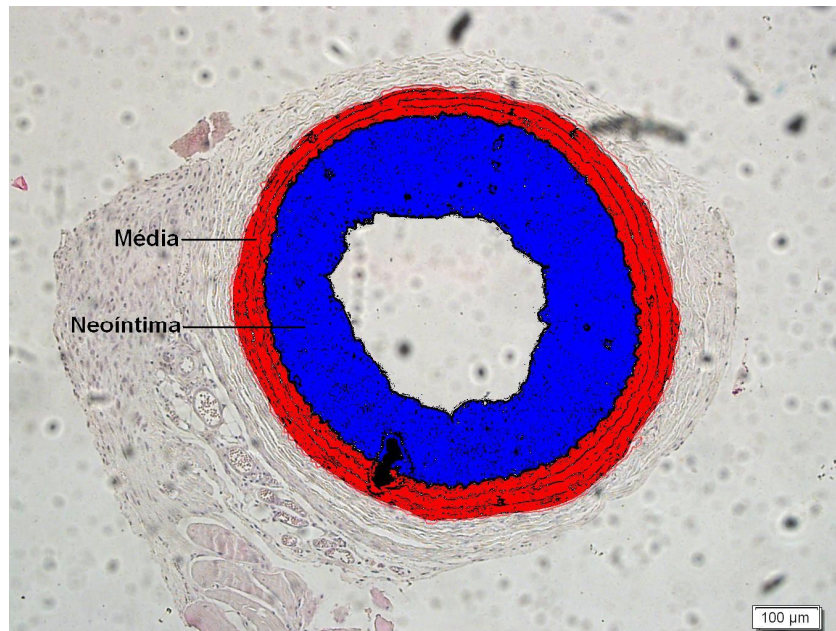


FIGURA 16 – REGIÕES DELIMITADAS PELOS POLÍGONOS MULTIPONTOS: MÉDIA E NEOÍNTIMA

FONTE: O autor (2010).

Isso foi feito com 4 cortes de 1 dia de lesão, 6 cortes de 7 dias de lesão, 8 cortes de 14 dias de lesão e 4 cortes de 21 dias de lesão e, devido ao fato de os cortes sham lesados sabidamente não apresentarem formação de neoíntima, mediu-se apenas 1 corte para cada dia de lesão.

A coloração com HE é o método de coloração mais popular em histologia, devido à facilidade, baixo custo e identificação direta de classes de substâncias. Envolve a aplicação de *hemalum*, complexo formado por íons de alumínio e hematoxilina oxidada, que cora substâncias basofílicas com variações de azul e violeta, e eosina, que cora substâncias eosinofílicas com variações de vermelho, rosa e laranja. Ela pode ser utilizada para analisar a qualidade do tecido fixado, bem como a presença de estruturas celulares (MERCK, 2010).

Para qualificação da presença das proteínas FN e QSOX, os cortes foram submetidos a diversas imuno-histoquímicas. O mecanismo básico da imuno-histoquímica é o reconhecimento do antígeno a ser pesquisado por um anticorpo específico, associado a diversos tipos de processos de visualização (FONTE MEDICINA DIAGNÓSTICA, 2010).

A técnica de IHQ mais usada é a indireta, quando, para identificar o anticorpo primário, utiliza-se um anticorpo secundário associado ao complexo streptavidina-biotina-enzima. O complexo é formado pela ligação de uma molécula de streptavidina com várias de biotina associadas a uma enzima (peroxidase ou fosfatase alcalina), que tem como função a conversão de um cromógeno incolor em um produto final que pode conferir diversas cores aos antígenos teciduais marcados. As áreas "positivas" coram com as cores mais comuns: castanho (peroxidase+ diaminobenzidina – DAB) e a vermelho (fosfatase alcalina + *Fast Red*) e as "negativas", o azul (com o corante utilizado para contracoloração, geralmente a hematoxilina) (LABORATÓRIO PREVENÇÃO & DIAGNOSE, 2010).

As lâminas fixadas foram colocadas à temperatura de fusão do material utilizado para inclusão, nesse caso a parafina – 60°, por cerca de uma hora. A parafina foi retirada com banhos de xilol (Farmanilquima) e reidratada com diferentes concentrações de alcoóis (CRQ). Se necessário pode-se realizar uma recuperação antigênica, pois as técnicas de fixação podem mascarar, fazer ligações cruzadas, ou mesmo destruir epítomos antigênicos (LABORATÓRIO PREVENÇÃO & DIAGNOSE, 2010).

O tecido teve as peroxidases endógenas bloqueadas através de banho em metanol (Bond Carneiro)+H₂O₂ (Tedia) a 1% por 45 minutos e as interações hidrofóbicas e iônicas inespecíficas bloqueadas com banho em Triton (Merck) e PBS+BSA (Sigma). Pode-se ainda bloquear fosfatases alcalinas através de banho com azida sódica em H₂O₂ e biotinas endógenas através de banhos com tampões alcalinos, leite desnatado ou pré-incubação com avidina.

Os anticorpos primários empregados anti-QSOX e anti-Fibronectina desenvolvidos no Laboratório de Patologia Redox da UFPR, tiveram que ser submetidos à titulação da imunomarcção, para identificar a melhor concentração de anticorpo a ser utilizada. Para a titulação, foram utilizados materiais preparados pelo ex-mestrando Joselito Getz – material J. Para esta IHQ, utilizou-se como anticorpo secundário associado ao complexo streptavidina-biotina-enzima o “kit LSAB” (Dako). Para as subseqüentes, foram utilizados materiais preparados pelo mestrando Axel Helmut Rulf Cofré – material A – e como anticorpo secundário foi utilizado o Envision™ System (Dako). Em ambas a revelação, que contém o substrato da enzima associada ao anticorpo secundário, ocorreu pela reação de oxidação do DAB (Dako). A contracoloração para identificação de negativos foi feita com hematoxilina filtrada (Merck) e as lâminas foram montadas com adesivo Entellan (Merck). As lâminas foram visualizadas em microscópio ótico Olympus e as imagens analisadas pelos programas DS2 Olympus e Image ProPlus 6.1.

4.4 DENSITOMETRIA

A análise densitométrica exige a inserção de alguns conceitos básicos com relação à análise de imagem. Uma imagem é definida como uma matriz de pontos, expressos em um determinado sistema de cores. A resolução de uma imagem é definida pelo produto do comprimento e da largura e coincide com a representação de sua área em pixels. Um pixel (Picture Element) é a menor parte da matriz de pontos, sendo os sistemas de cores mais comuns que podem representá-lo CMYK (Ciano, Magenta, Yellow and Black), RGB (Red, Green and Blue) e Escala de Cinza.

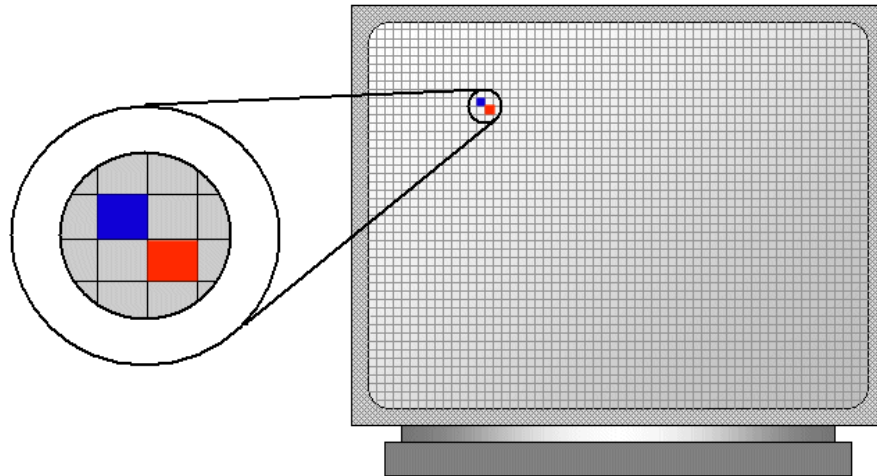


FIGURA 17 – PIXELS: UNIDADES FORMADORAS DE IMAGEM

FONTE: FUNCTIONX TUTORIALS – GDI+Acessories (2010).

Para imagens representadas em RGB 24, cada pixel é formado pela composição das três cores – vermelho, verde e azul – em que cada componente varia entre os valores 0 e 255. Assim, caso as três componentes sejam máximas, a cor será Branco e, caso sejam nulas, a cor será Preto. Um pixel RGB representado por (0, 0, 255) é equivalente ao máximo de intensidade em azul, visto que as outras duas componentes são nulas. Um exemplo mais complexo representado por (160, 82, 45) é equivalente a um tom de marrom, denominado Sienna.

Se todas as componentes forem de um mesmo valor qualquer, a resultante será um tom de Cinza. Portanto uma cor RGB pode ser representada na Escala de Cinza ao realizar a média de suas componentes. Esse valor não pode ser convertido novamente em RGB, visto que existem vários conjuntos de três componentes que podem ser representados pela mesma média. Isso faz com que na representação em Escala de Cinza ocorra a perda de informação acerca da cor RGB original do pixel.

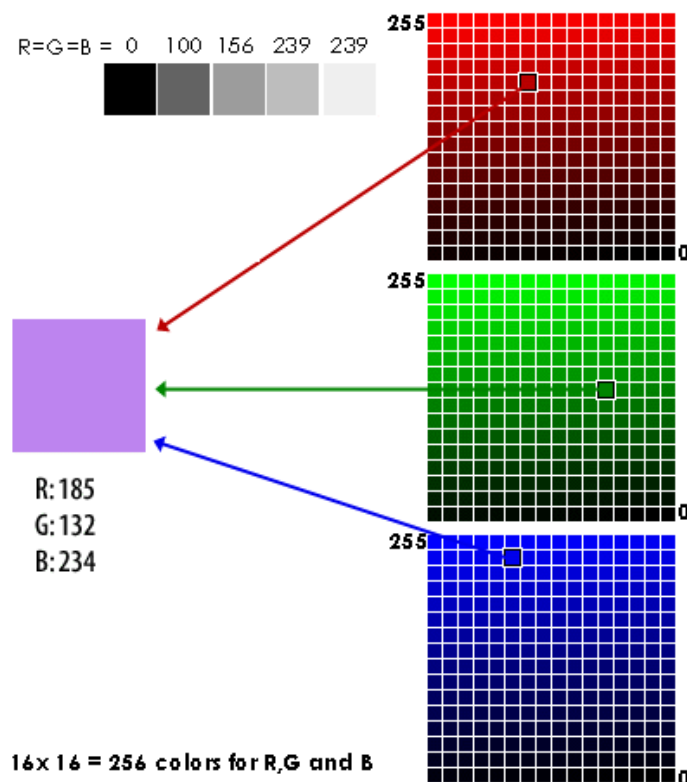


FIGURA 18 – O SISTEMA RGB

FONTE: DEPARTAMENT OF COMPUTING SCIENCE - CMPUT 301 (2010).

Para imagens obtidas através de transmissão de luz, em que a fonte de luz e o sensor de captura de imagem estão posicionados em lados opostos de uma amostra de interesse não opaca, pode-se obter a densidade ótica (DO) dessa imagem. A densidade ótica representa a relação entre a intensidade de luz incidente e a quantidade de luz absorvida pela amostra, permitindo quantificar a presença de determinado material de interesse. Essa relação é matematicamente expressa pela seguinte equação:

$$DO_{(x,y)} = -\log \left[\frac{\text{intensidade}_{(x,y)} - \text{"PRETO"}}{\text{"INCIDENTE"} - \text{"PRETO"}} \right]$$

Sendo, "PRETO" o valor na escala de cinza da quantidade de luz que passa pelo material de interesse na amostra; "INCIDENTE" o valor na escala de cinza da máxima luz transmitida e $\text{intensidade}_{(x,y)}$ o valor na escala de cinza, ou seja, a média das componentes RGB para cada ponto, ou região de mesma intensidade para o material analisado.

"PRETO" e "INCIDENTE" são valores calibrados para cada imagem, pois o ajuste no tempo de exposição do sensor de captura pode alterar a intensidade da

luz. Matematicamente, a escala logarítmica determina que quando a intensidade_(x,y) se aproximar de “PRETO”, a concentração de material naquele ponto ou região será a máxima calibrada para aquela imagem.

A seleção do ponto ou região que identifica a intensidade_(x,y) pode ser calibrada com relação à sensibilidade. Isso quer dizer que tons RGB próximos podem ou não ser selecionados dependendo da sensibilidade desejada. Quanto maior a sensibilidade, mais precisa é a identificação do tom que caracteriza a intensidade_(x,y).

Para cada corte, num aumento de 10x, foi realizada a calibração dos componentes “PRETO” e “INCIDENTE” e a sensibilidade, que determina os tons que identificam a marcação, nesse caso, tons de marrom, foi ajustada com o valor máximo permitido pelo programa Image ProPlus 6.0.

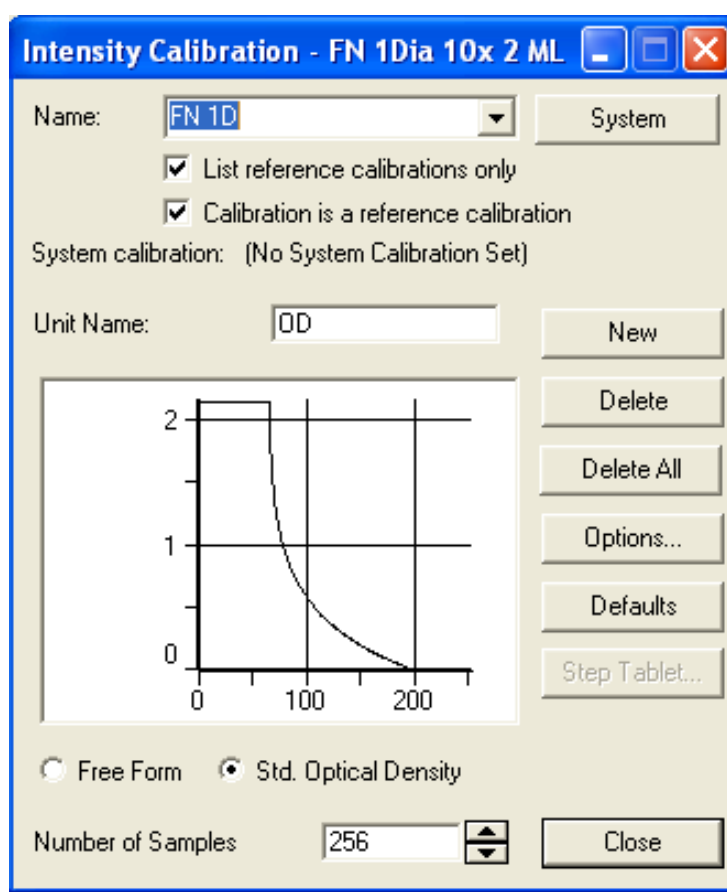


FIGURA 19 – JANELA DE CALIBRAÇÃO DO PROGRAMA IMAGE PROPLUS 6.0

Calibração dos valores RGB definidos como “PRETO” E “INCIDENTE” para as amostras do corte de 1 dia de lesão corado com anticorpo anti-FN.

FONTE: IMAGE-PRO® PLUS - Start-Up Guide (2005).

Devido a não uniformidade das imagens que identificam cada corte, foram obtidas quatro amostras de cada camada, da cada dia de lesão, cada uma com uma área de 1200 pixels, que representarão a imagem total da camada. A camada adventícia é desprezada nesta medição, por apresentar uma grande quantidade de ligações inespecíficas.

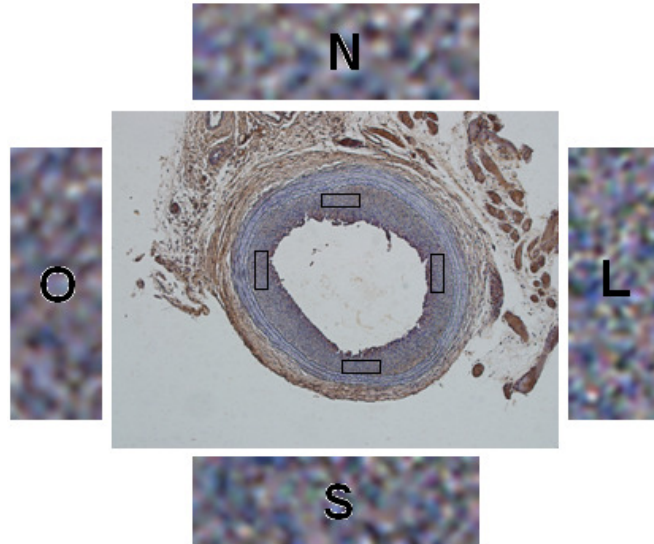


FIGURA 20 – REPRESENTAÇÃO DAS QUATRO AMOSTRAS DA CAMADA ÍNTIMA OBTIDAS EM CADA CORTE

FONTE: O autor (2010).

A análise semiquantifica a imunomarcacão presente nas camadas íntima e média – através da mensuração da quantidade de pixels coloridos com a cor selecionada para representar a marcação – e a determinação da intensidade da cor média presente em cada corte.

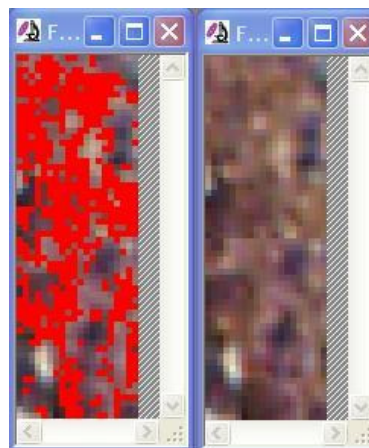


FIGURA 21 – PIXELS CONSIDERADOS MARCADOS NUMA AMOSTRA, APÓS A CALIBRAÇÃO DO CORTE

Os pontos em vermelho indicam tons que foram considerados marcados pelo programa.

FONTE: O autor (2010).

Assim, as medições selecionadas para serem amostradas pelo programa através dessa seleção de pontos marcados em cada amostra foram: a área, a quantidade de pixels considerados marcados por região, a densidade ótica média de cada componente RGB e a densidade ótica integrada (DOI), que é o somatório das médias das componentes RGB de cada região ponderada pela área ocupada dessas regiões.

Através da razão entre o número de pixels considerados marcados e a área total de cada amostra, obteve-se a taxa de ocupação da marcação em cada amostra. Obteve-se a média aritmética das quatro amostras, bem como o desvio padrão, para representar a taxa de ocupação de marcação de toda a camada amostrada.

Realizou-se o somatório das DOI de todas as amostras, obtendo-se a DOI cumulativa. A razão entre a DOI cumulativa e o somatório das áreas das quatro amostras demonstra a densidade de marcação de forma uniforme sobre a camada amostrada. O valor obtido determina o índice de proporcionalidade pelo qual as diferentes quantidades de material espalhados nas regiões amostradas deveriam ser multiplicados para se obter a quantidade média de material distribuído uniformemente. Devido ao fato da quantidade de proteína não poder ser mensurada através das técnicas utilizadas, esse valor identifica apenas a quantidade de luz relativa que atravessa o material, demonstrada pela transparência da cor, caso a marcação estivesse distribuída uniformemente por toda a camada.

Com a DO de cada componente RGB, realizou-se a função inversa de obtenção dessa DO, levando em consideração a calibração de cada corte. Esse cálculo foi realizado para se obter a intensidade média de cada componente RGB, a fim de caracterizar o marrom médio da marcação de cada camada.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 RELAÇÃO ÍNTIMA-MÉDIA

A Figura 22 mostra o gráfico gerado pelas médias e o desvio padrão de cada dia de lesão comparativamente aos sham lesados, em que o eixo das abscissas foi deslocado 0,1 negativo para que o zero pudesse ser representado.

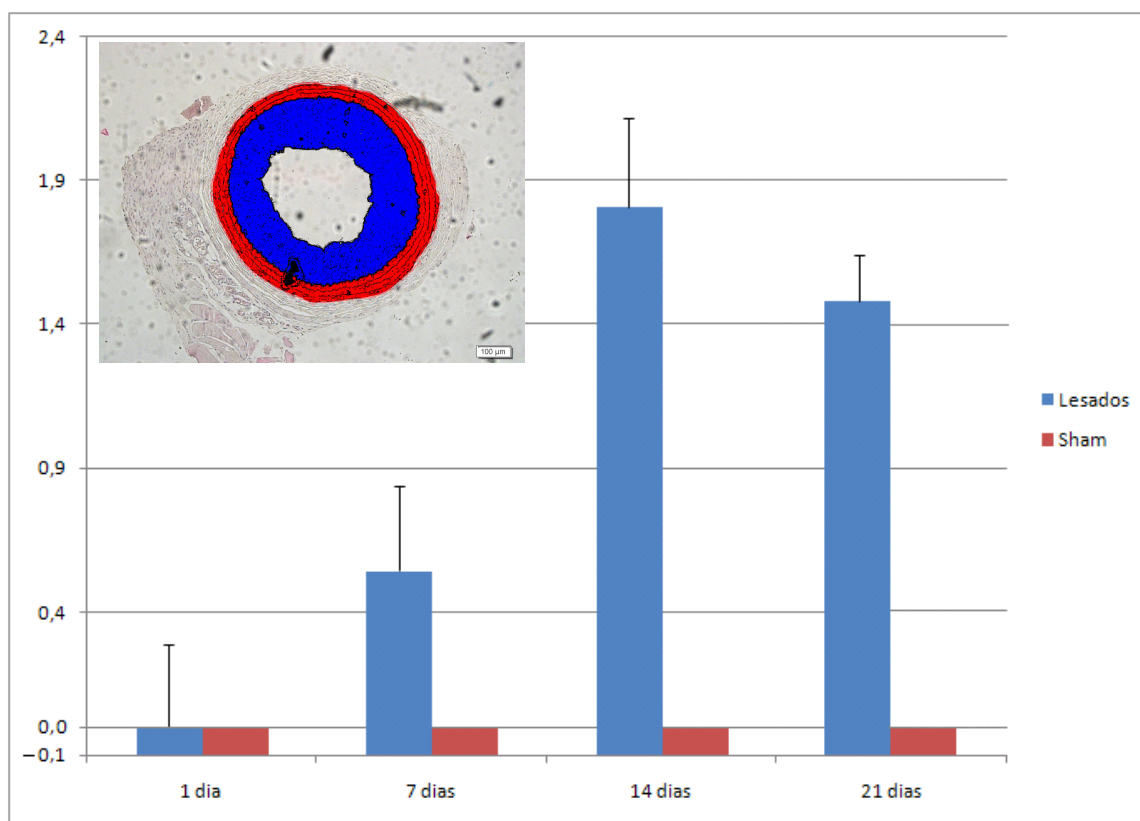


FIGURA 22 – RELAÇÃO NEOÍNTIMA-MÉDIA NA PROGRESSÃO DA REESTENOSE

Por se tratar de uma relação entre números que possuem a mesma unidade, os valores finais representados na ordenada do gráfico são adimensionais.

FONTE: O autor (2010).

A coloração com HE demonstrou que a proporção entre a espessura da camada neoíntima formada e a camada média é condizente com o esperado, revelando que o modelo animal que se utiliza está sendo corretamente manipulado, devido à formação da reestenose ser bem pronunciada.

As medições realizadas para determinar o aumento da proporção demonstram claramente a progressão da reestenose até o 14º dia, com posterior estabilização e remodelamento vascular até aproximadamente o 21º dia.

5.2 IMUNO-HISTOQUÍMICA (IHQ)

Na titulação dos anticorpos contra QSOX e contra FN, a concentração identificada como ótima para ambos foi de 1:400. Após a titulação, utilizando o material A, fez-se a primeira IHQ para identificar a presença da QSOX e FN. Os cortes das carótidas não coraram, mas os cortes da vesícula seminal de rato – utilizados como controle positivo para ambas as proteínas – coraram.

Fez-se outra IHQ com os cortes de ambos os materiais, J e A, para identificar se a ausência da imunomarcação era devida às condições de emblocamento, apesar de ter sido utilizado o mesmo protocolo para ambos. Para esta foram utilizados anticorpos primários na concentração de 1:200 e de 1:400. Novamente, apenas os controles positivos coraram, como mostra a Figura 23.

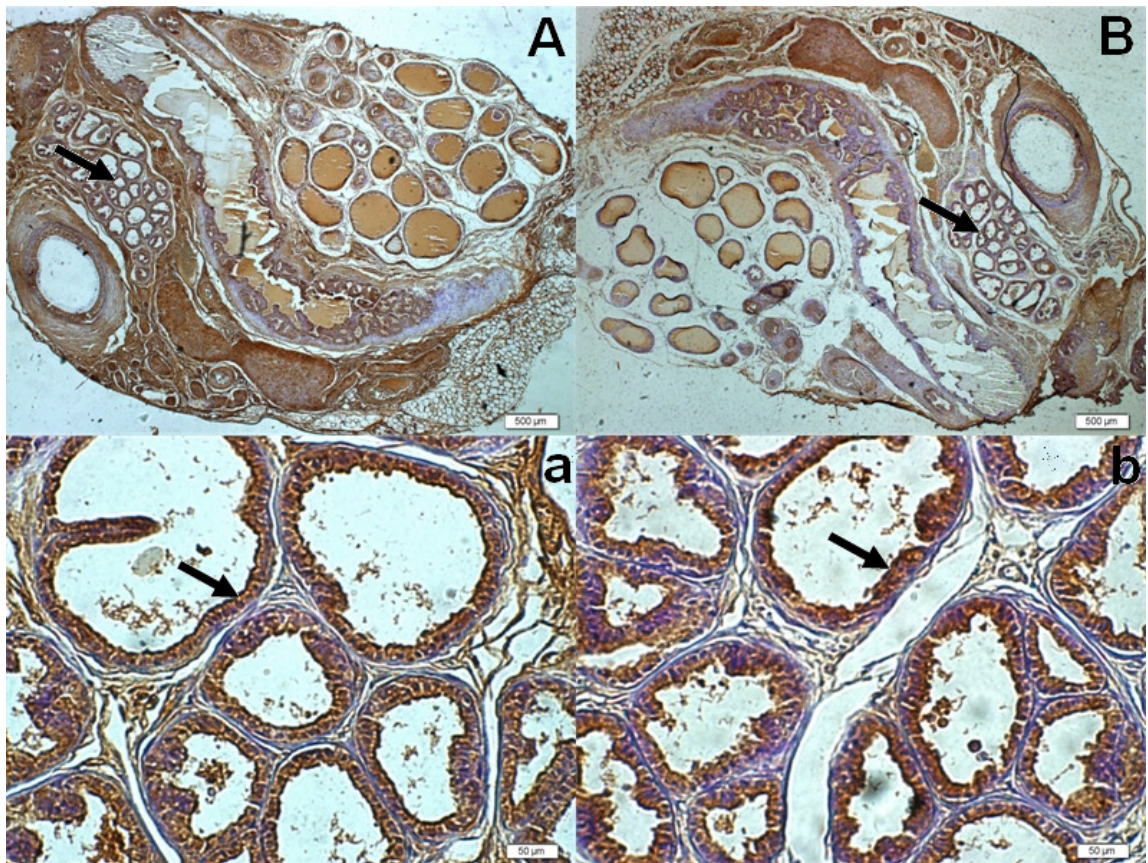


FIGURA 23 – CONTROLE POSITIVO

Em (A) e (a), vesícula seminal de rato corada com anti-FN, concentração 1:200 com aumento de 10x e 40x, respectivamente; em (B) e (b), vesícula seminal de rato corada com anti-QSOX, concentração 1:200 com aumento de 10x e 40x, respectivamente.

FONTE: O autor (2010).

Fez-se uma terceira IHQ com as mesmas concentrações utilizadas anteriormente, 1:200 e 1:400, modificando-se vários parâmetros: utilizou-se tubo lacrado de H₂O₂; utilizaram-se alíquotas novas de ambos os anticorpos primários e utilizou-se tubo lacrado de Envision™ System. Esta IHQ resultou em cortes de carótidas fracamente corados se comparados à primeira titulação, realizada com o material J.

Devido à coloração insuficiente das carótidas em várias tentativas de IHQ, estes resultados não foram considerados válidos para serem apresentados no presente trabalho. Para este, aproveitaram-se resultados obtidos anteriormente à primeira titulação, em março de 2010. Esta IHQ foi realizada utilizando-se o material J e a concentração dos anticorpos primários estabelecida pelo ex-mestrando Joselito Getz – 1:400. O anticorpo secundário utilizado foi o “kit LSAB”.

5.2.1 Anti-QSOX

O resultado das IHQs realizadas no mês de março de 2010 para detectar a presença de QSOX no tecido lesado é mostrado na Figura 24 com aumento de 10x e de 40x.

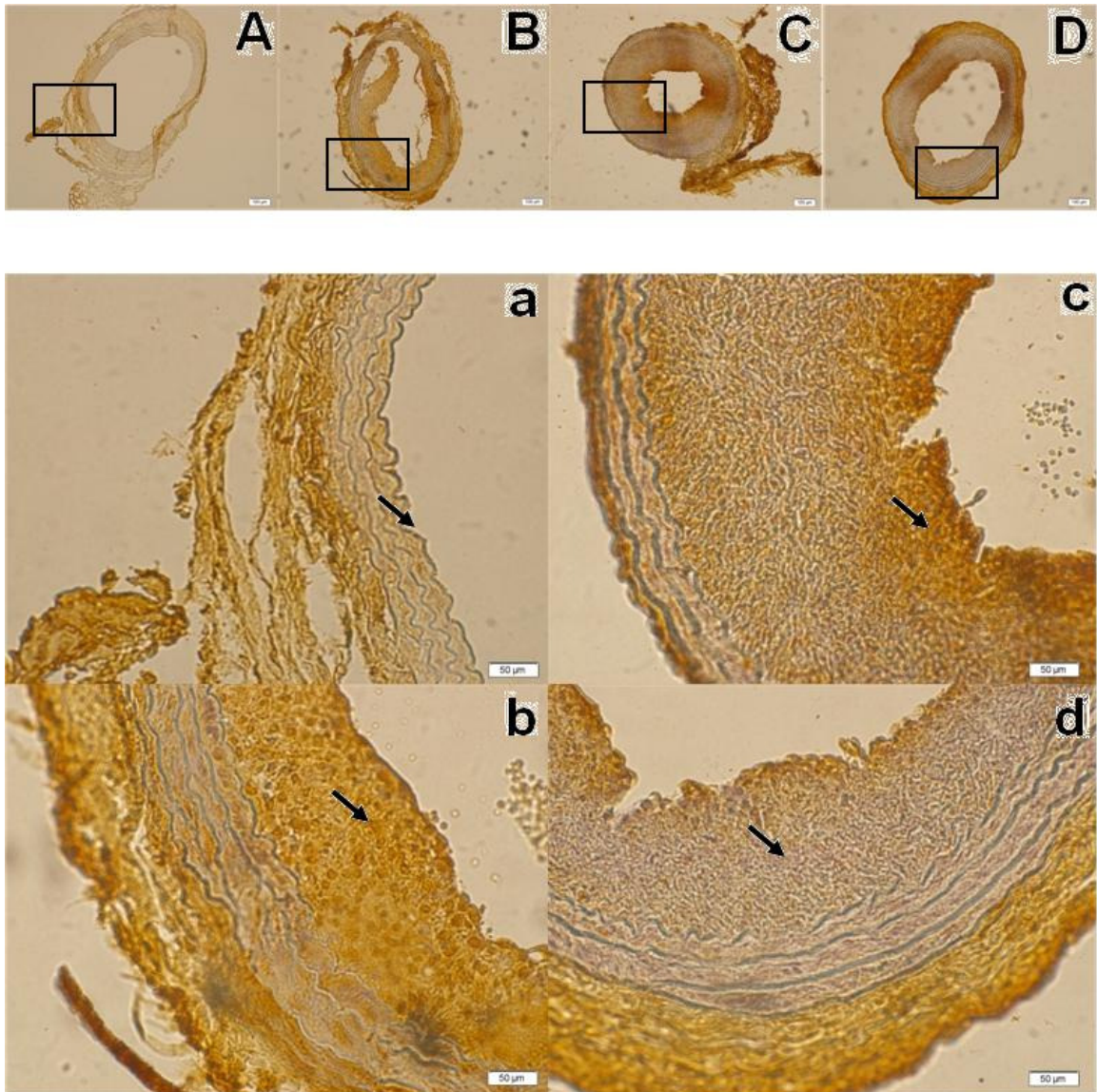


FIGURA 24 – IDENTIFICAÇÃO DA PRESENÇA DE QSOX EM CARÓTIDAS LESIONADAS

Em (A) e (a) lesão de 1 dia com aumento de 10x e 40x, respectivamente, a flecha indica a não formação de neointima adjacente à média; em (B) e (b) lesão de 7 dias com aumento de 10x e 40x, respectivamente; em (C) e (c) lesão de 14 dias com aumento de 10x e 40x, respectivamente e em (D) e (d) lesão de 21 dias com aumento de 10x e 40x, respectivamente. Em (b), (c) e (d) a flecha indica a marcação do anticorpo na camada neointima formada.

FONTE: O autor (2010).

O resultado é claramente positivo para todos os dias de lesão, pois a análise microscópica revela a intensa marcação do antígeno na neointima formada e alguma marcação inespecífica na média e na adventícia, indicando um possível excesso no título do anticorpo, ou alta eficiência de marcação do anticorpo secundário e do revelador.

5.2.2 Anti-FN

O anticorpo anti-FN utilizado continha contaminação com anti-BSA, devido a falhas no processo de purificação. Para realizar as IHQs, o anticorpo, então, foi previamente incubado com PBS+BSA a 10% *overnight* a 4°C, a fim de bloquear a atividade do anti-BSA e evitar marcações inespecíficas. As Figuras 25 e 26 mostram o resultado do *Western Blot* realizado para confirmar o bloqueio do anti-BSA e os cortes de carótidas corados com o anticorpo primário com e sem o bloqueio do anti-BSA, respectivamente.

O BSA, proteína de aproximadamente 60kD, corre até o final do gel, enquanto a FN, proteína dimérica de aproximadamente 330kD corre apenas o início do gel. Assim, a identificação de ambos torna-se facilitada e não há necessidade do uso de marcador de peso molecular.

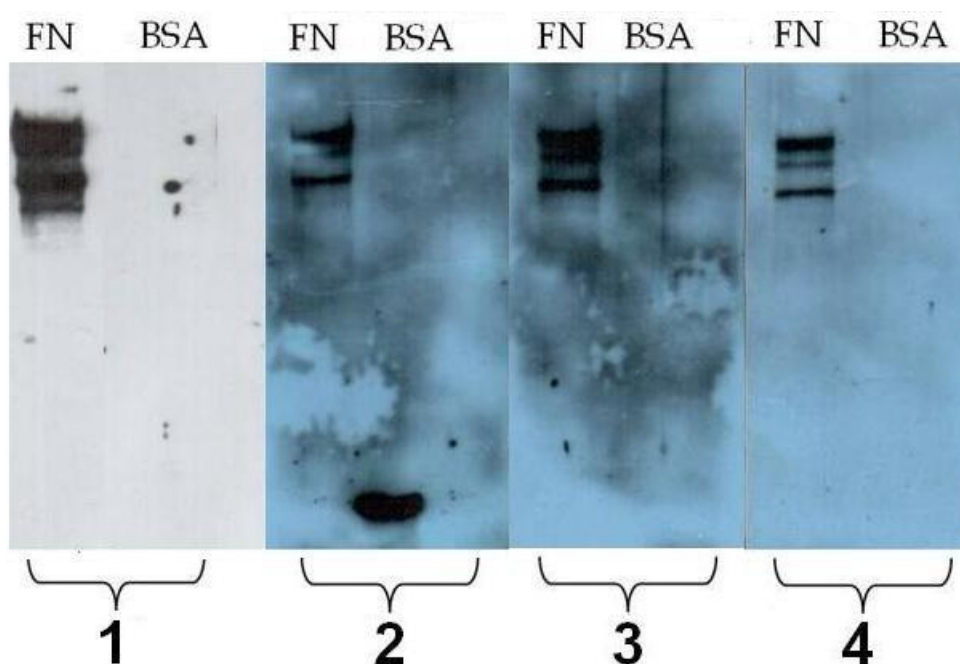


FIGURA 25 – RESULTADO DO BLOQUEIO DO ANTICORPO ANTI-BSA EM *WESTERN BLOT*

Em (1) anticorpo anti-FN fornecido pelo Professor Sílvia Sanches, sem bloqueio não marca BSA; em (2) anticorpo anti-FN produzido pelo laboratório com titulação 1:400 incubado apenas com PBS *overnight*, em que se identifica a marcação da FN e do BSA ; em (3) anticorpo anti-FN com titulação 1:400 incubado previamente com PBS+BSA 10% *overnight*, em que se identifica apenas a marcação da FN e em (4) anticorpo anti-FN com titulação 1:800 incubado previamente com PBS+BSA 10% *overnight*, em que ainda se identifica a marcação da FN.

FONTE: O autor (2010).

O resultado do *Western Blot* mostra a efetividade da incubação *overnight* do anti-FN com PBS+BSA a 10% para bloquear os anticorpos contaminantes (anti-

BSA). A titulação de 1:800 não foi utilizada para as IHQ, pois o *Western Blot* é significativamente mais sensível.

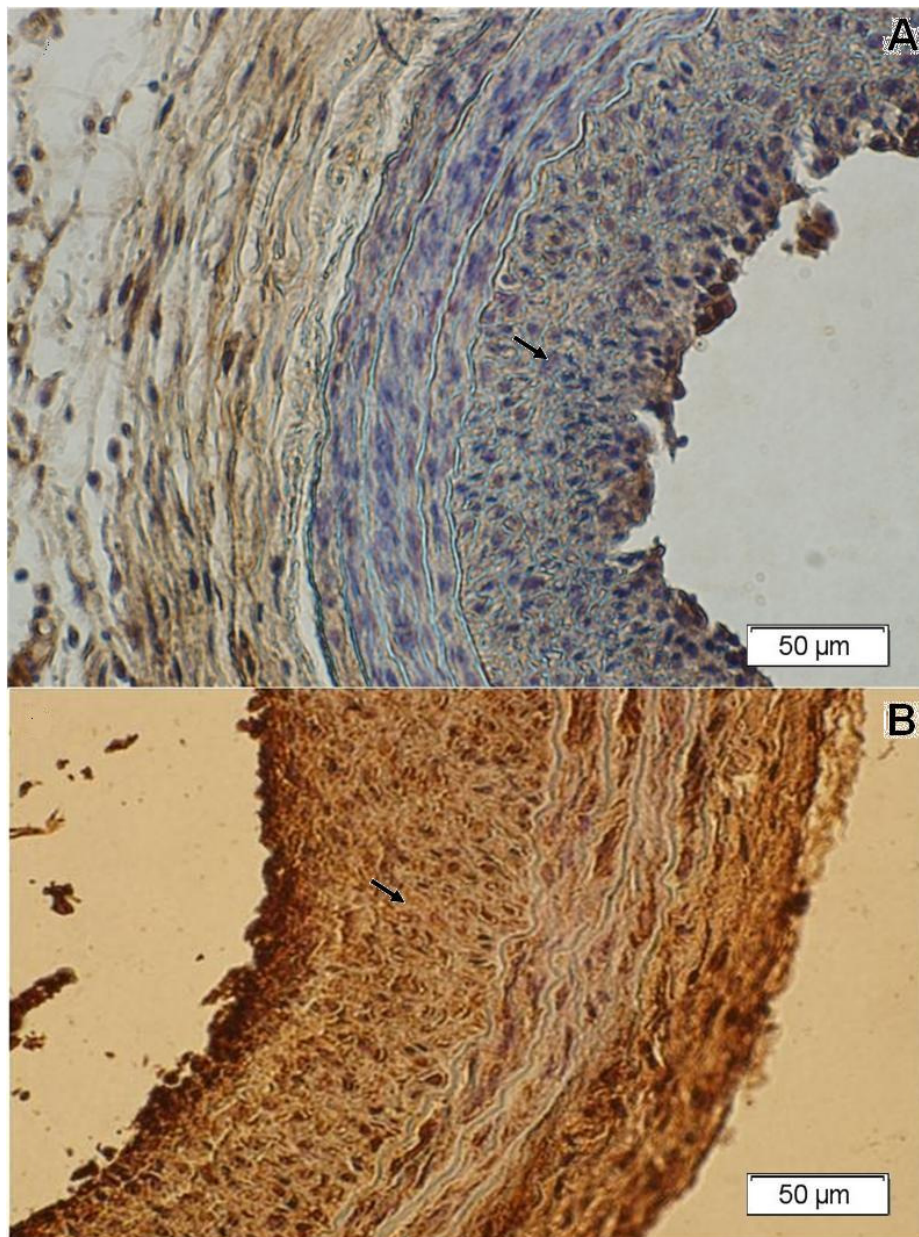


FIGURA 26 – BLOQUEIO DO ANTICORPO ANTI-BSA EM CORTES DE CARÓTIDAS

Em (A) o corte foi corado com anticorpo anti-FN bloqueado com PBS+BSA 10% *overnight* e em (B) o corte foi corado com anticorpo anti-FN sem bloqueio com PBS+BSA 10%. Em ambos os cortes a titulação do anticorpo foi 1:400 e o aumento de 40x.

FONTE: O autor (2010).

Os cortes de carótidas sham lesadas foram corados apenas com anti-FN com PBS+BSA a 10% com titulação de 1:200, pois todos os animais sham apresentaram basicamente o mesmo padrão sem a formação de neointima, como mostrado na Figura 27.

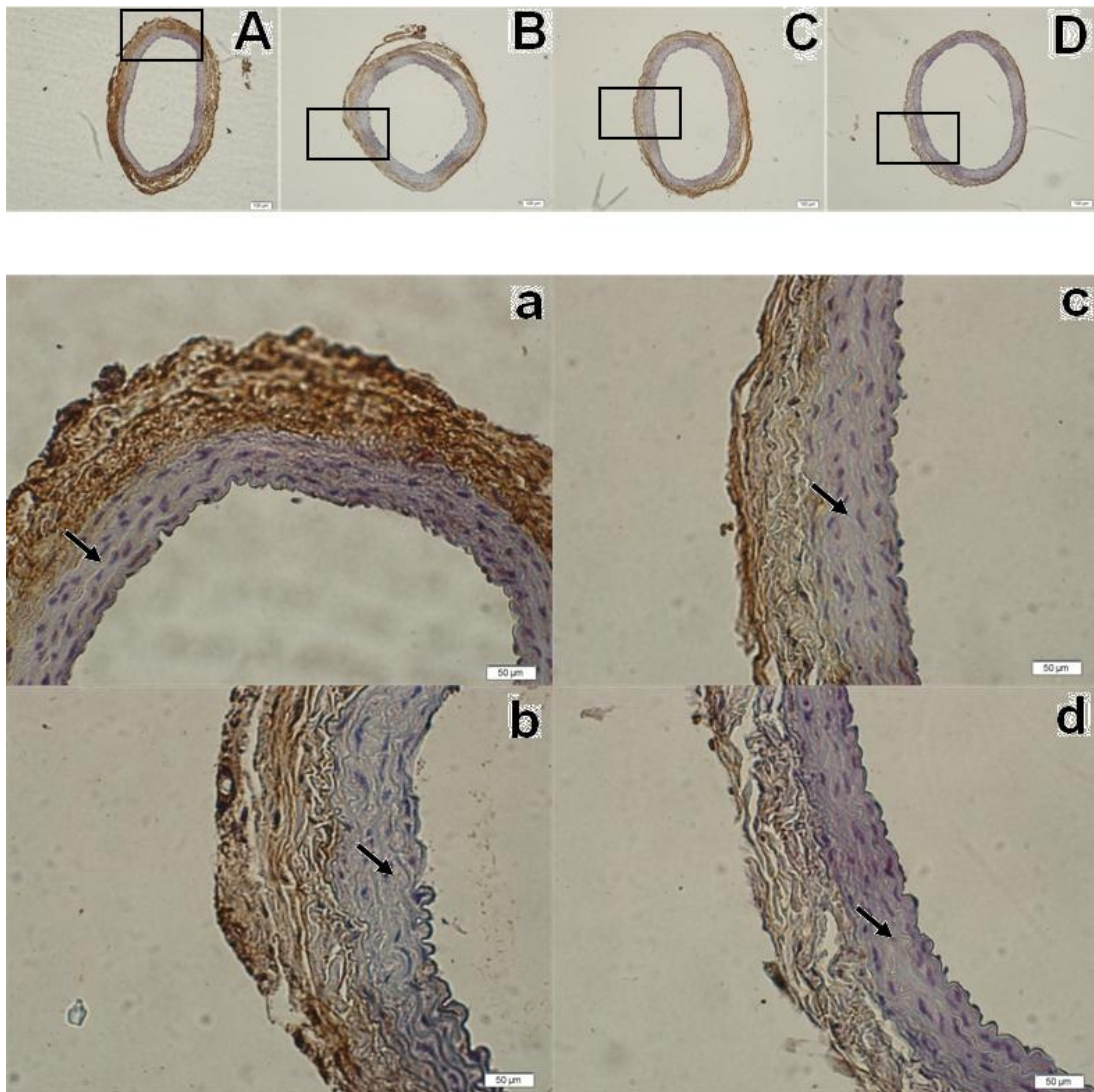


FIGURA 27 – LESÕES SHAM CORADAS COM ANTI-FN

Em (A) e (a), lesão sham de 1 dia com aumento de 10x e 40x, respectivamente; em (B) e (b), lesão sham de 7 dias com aumento de 10x e 40x, respectivamente; em (C) e (c), lesão sham de 14 dias com aumento de 10x e 40x, respectivamente e em (D) e (d), lesão sham de 21 dias com aumento de 10x e 40x, respectivamente. As flechas indicam a média sem formação de neointima adjacente apresentando apenas a contracoloração (Hematoxilina).

FONTE: O autor (2010).

O resultado dos cortes sham lesados está de acordo com a literatura revista, visto que nesse tipo de lesão não há a inserção do cateter-balão e, portanto, não há desnudação endotelial que acarretaria em formação de neointima. Todos os cortes sham analisados não apresentaram formação de neointima e a média apresenta-se corada apenas com a contracoloração, independente do anticorpo primário, possivelmente indicando que quando não há formação de neointima, não existe concentração de FN, nem de QSOX suficientes para serem identificadas neste tecido.

O resultado das IHQs realizadas para detectar a presença de FN no tecido lesado é mostrado na Figura 28 com aumento de 10x e de 40x. O anticorpo primário utilizado foi o mesmo anticorpo com titulação 1:400 incubado com PBS+BSA 10% *overnight* usado para realizar o *Western Blot* citado acima.

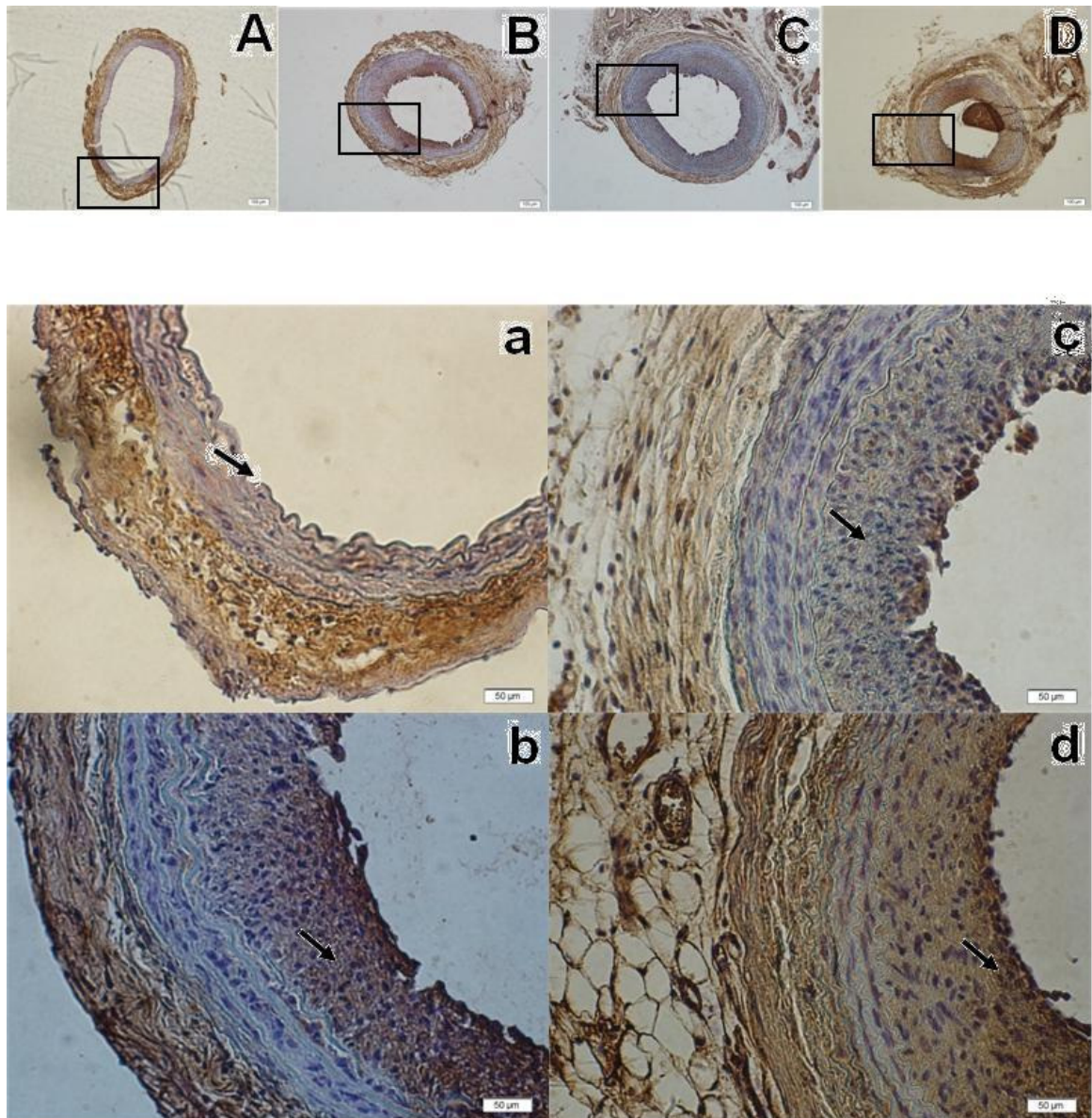


FIGURA 28 – IDENTIFICAÇÃO DA PRESENÇA DE FN

Em (A) e (a) lesão de 1 dia com aumento de 10x e 40x, respectivamente, a flecha indica a não formação de neoíntima adjacente à média; em (B) e (b) lesão de 7 dias com aumento de 10x e 40x, respectivamente; em (C) e (c) lesão de 14 dias com aumento de 10x e 40x, respectivamente e em (D) e (d) lesão de 21 dias com aumento de 10x e 40x, respectivamente. Em (b), (c) e (d) a flecha indica a marcação do anticorpo na camada neoíntima formada.

FONTE: O autor (2010).

O resultado também é claramente positivo para todos os dias de lesão. Apesar de as imagens estarem em um tom azulado, pode-se identificar marcação positiva na neoíntima formada e marcações inespecíficas mais fracas na média e na adventícia, indicando que o título do anticorpo estava no limite de marcação.

A imuno-histoquímica mostrou ser uma ferramenta confiável, pois detectou facilmente os antígenos citados em todos os dias de lesão. Depois de trocar todos os componentes que poderiam interferir no processo, conjecturou-se que a inconsistência dos resultados obtidos com o material A deveria estar no anticorpo secundário, Envision™ System. Inclusive, este anticorpo não está mais disponível no site do fabricante e, portanto, não é mais comercializado, inviabilizando a repetibilidade do processo com novo lote. Cogita-se a possibilidade de reutilização do kit LSAB como anticorpo secundário ou, mesmo, a realização de uma recuperação antigênica nos cortes, para poder identificar a causa das inconsistências ocorridas.

Quanto à presença dos antígenos, pode-se supor, devido à marcação, que eles ocupem o tecido simultaneamente durante o processo de reestenose pós-lesão por cateter-balão. Essa presença simultânea pode indicar uma relação de funcionalidade entre as duas, visto que a função da QSOX parece estar intimamente relacionada à montagem e manutenção de proteínas de MEC e que a FN se caracteriza como uma proteína de MEC.

5.3 ANÁLISE DENSITOMÉTRICA

As três informações encontradas através da análise dos valores obtidos pelo programa Image ProPlus 6.0: a taxa de ocupação, a tonalidade do marrom-médio e a intensidade média de marcação para cada camada (íntima e média) para cada dia de lesão, estão demonstradas na Figura 29, com a marcação de QSOX e na Figura 30, com a marcação de FN. A taxa de ocupação, por ser a razão entre o número de pixels marcados pelo número de pixels totais é igual a um número adimensional entre 0 e 1. A DOI estabelece um número que indica a intensidade de marcação de cada pixel, assim pode-se mensurar a intensidade de marcação nas amostras que representam cada camada. A tonalidade de marrom-médio representa a tonalidade considerada marcada para cada camada.

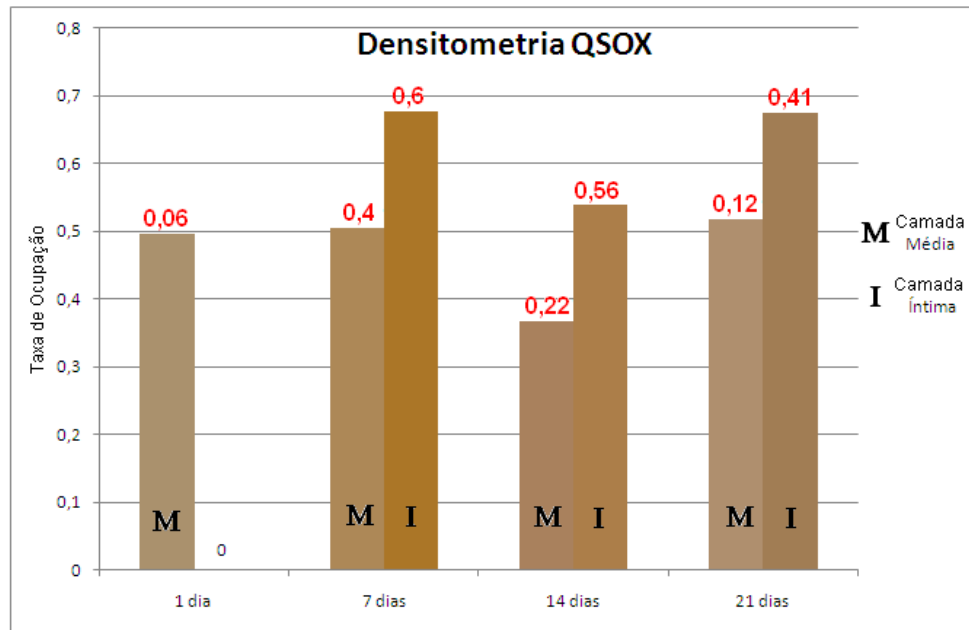


FIGURA 29 – ANÁLISE DENSITOMÉTRICA PARA A PRESENÇA DE QSOX

A taxa de ocupação é representada na ordenada; o tom de marrom médio é representado pela cor de preenchimento de cada coluna; a mensuração da quantidade de material através da transparência (intensidade) é representada pelo número em vermelho acima da coluna; as camadas íntima e média estão representadas pelas siglas I e M, respectivamente; e os dias de lesão estão representados na abscissa.

FONTE: O autor (2010)

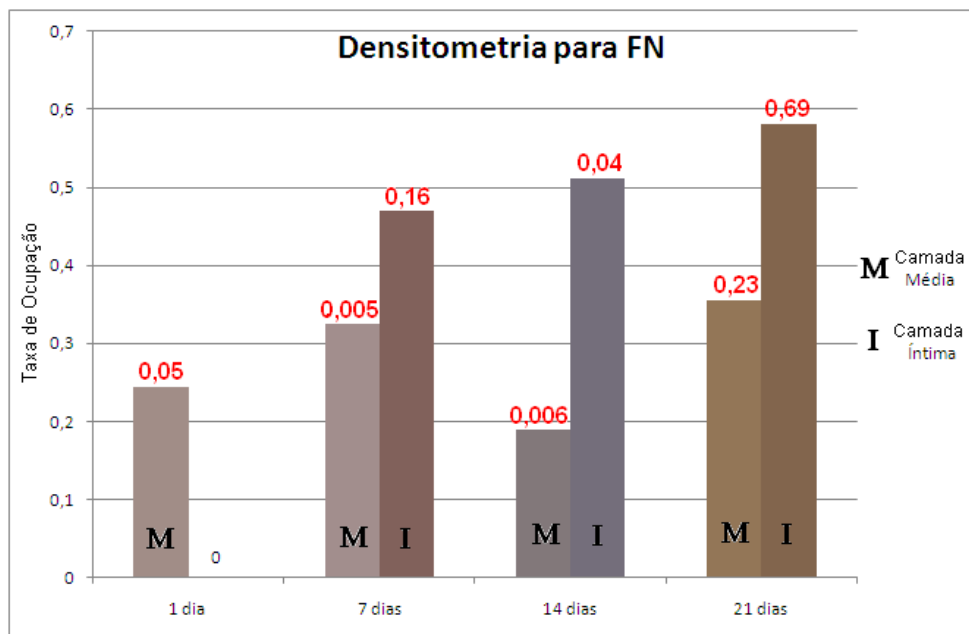


FIGURA 30 – ANÁLISE DENSITOMÉTRICA PARA A PRESENÇA DE FN

A taxa de ocupação é representada na ordenada; o tom de marrom médio é representado pela cor de preenchimento de cada coluna; a mensuração da quantidade de material através da transparência (intensidade) é representada pelo número em vermelho acima da coluna; as camadas íntima e média estão representadas pelas siglas I e M, respectivamente; e os dias de lesão estão representados na abscissa.

FONTE: O autor (2010)

As diferenças na intensidade dos antígenos, bem como na taxa de ocupação podem ser explicadas devido aos processos de migração, proliferação e mudança fenotípica das principais células – VSMC e fibroblastos – que secretam estas proteínas, modulando a reestenose.

Para a marcação de QSOX, pode-se verificar pequena variação tanto da taxa de ocupação quanto de intensidade de marcação entre as camadas íntima e média, prevalecendo, em todos os dias, os maiores valores na íntima. Por outro lado, devido à intensa marcação dos cortes, os valores de intensidade da média podem ter sido superestimados. Isso pode ter ocorrido devido à titulação excessiva do anticorpo, ao excesso de exposição ao revelador, às condições de luz, contraste, tempo de exposição das fotos ou, mesmo, por alta inespecificidade da alíquota do anticorpo utilizada.

Ainda, os valores da intensidade (rótulo em vermelho) indicam um aumento de antígeno a partir do 7º dia de lesão, com posterior decaimento desse, sugerindo, talvez, que como a MEC se estabiliza ao longo da progressão da lesão, até, aproximadamente, o 21º dia, a quantidade de QSOX que permanece seja suficiente apenas para manutenção das proteínas de MEC que agora formam a neoíntima. Além disso, apesar de a intensidade diminuir, a taxa de ocupação varia entre alta nos 7 dias iniciais, decai no 14º dia e torna a subir no 21º dia, o que pode identificar a alta produção de todas as células nos primeiros dias, seguida de atuação da proteína em regiões específicas no ápice da produção de MEC (14º dia) e posterior “espalhamento” no tecido novamente para manutenção dessas proteínas de MEC.

Para a marcação de FN, a variação tanto de intensidade, quanto da taxa de ocupação é mais diversa. Isso pode significar que a presença de FN depende de outros tipos celulares além das VSMC, como, por exemplo, fibroblastos provenientes da adventícia. Isso explicaria a presença de FN na neoíntima no 7º dia: os fibroblastos que migraram da adventícia produziram fibras de FN detectáveis já nos primeiros dias, visto que neste período a quantidade de QSOX também é máxima. Mas no 14º dia, ápice da formação neointimal, a própria migração das VSMC degradaria grande parte das fibras de FN, o que acarreta em um número de intensidade extremamente baixo, porém uma taxa de ocupação crescente, encontrados para este dia. Já no 21º dia, com a atividade das VSMC estabilizada, assim como a MEC formada, a quantidade e a intensidade de FN detectada na neoíntima e na média são máximas.

As variações para os antígenos dos três parâmetros analisados podem ainda ser artefatos devido, principalmente, à falta de parametrização, pois desde o corte dos blocos não se pode mais garantir que as condições para a análise densitométrica sejam as mesmas. Podem ocorrer, por exemplo, variações na espessura dos cortes, pois, apesar do micrótomo estar ajustado para cortar lâminas com 7 μ m, a parafina possui resistência diferente do tecido emblocado, o que pode acarretar em deformação deste durante o corte, fornecendo cortes com aproximadamente 7 μ m, mas não exatamente. Essas pequenas variações de espessura podem fazer diferença durante a IHQ (cortes mais espessos exigem uma titulação maior do anticorpo primário) e, principalmente, durante o processo de digitalização das imagens, pois se a espessura dos cortes varia, deve variar também o contraste, o tempo de exposição, as condições de luz para obter imagens com qualidade. Assim, cada corte deveria ter sido calibrado pelo programa levando em consideração todas essas diferenças de parâmetros, o que não foi realizado para o presente trabalho.

6 CONCLUSÃO

Depois de teoricamente caracterizados o sistema vascular e seus principais componentes, a aterogênese, a angioplastia transluminal coronariana, o uso de *stents*, a reestenose e seus principais processos *redox* e o modelo animal utilizado e, através da análise dos resultados obtidos, pôde-se verificar que estes estão em conformidade com a revisão de literatura descrita.

A análise da relação íntima-média foi conforme esperado, o que afirma o modelo animal que está sendo utilizado, assim como todo o procedimento de obtenção do tecido analisado.

O protocolo de IHQ utilizado é extremamente viável, pois qualificou ambos os antígenos testados e, além disso, foi possível detectar em que passo pode haver diferença de marcação.

A quantificação exata das proteínas através da análise densitométrica não é possível utilizando-se o método de imunomarcação, pois as variáveis a serem parametrizadas são muitas e, muitas vezes, não está ao alcance do manipulador não modificá-las. Apesar disso, a análise é uma ferramenta extremamente útil para identificar a quantidade de marcação nas camadas observadas.

Trabalhos posteriores visam:

- a) testar o protocolo de imunomarcação voltando a utilizar o anticorpo secundário “kit LSAB”;
- b) parametrizar algumas variáveis de digitalização de imagens, a fim de realizar análises densitométricas mais confiáveis e;
- c) realizar ensaios imuno-fluorescentes, a fim de detectar a possível colocação dos antígenos QSOX e FN.

REFERÊNCIAS

AZEVEDO, L. C. P.; PEDRO, M. de A.; SOUZA, L. C.; SOUZA, H. P. de; JANISZEWSKI, M.; LUZ, P. L. da; LAURINDO, F. R. M. Oxidative stress as a signaling mechanism of the vascular response to injury: The redox hypothesis of restenosis, **Cardiovascular Research**, v. 47, p. 436-445, Santa Catarina, 2000.

BAUTERS, C.; ISNER, J. M. The biology of restenosis, **Progress in Cardiovascular Diseases**, v. 40, n. 2, p. 107-116, Boston, 1997.

BENAYOUN, B.; ESNARD-FÈVE, A.; CASTELLA, S.; COURTY, Y.; ESNARD, F. Rat seminal vesicle FAD-dependent Sulfhydryl Oxidase: biochemical characterization and molecular cloning of a member of the new Sulfhydryl Oxidase/quiescin Q6 gene family, **The Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 17, p. 13830-13837, 2001.

CARAMORI, P. R. A.; YAMAMOTO, G. I.; ZAGO, A. J. Reestenose pós-angioplastia: fisiopatogenia, **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 69, n. 2, p. 141-150, 1997.

CHEEMA, S. K. **Advances in biochemistry in health and disease**. New York: Springer, 2006. v. 1: Biochemistry atherosclerosis.

CHEN, J-P.; YU, S-C.; HSU, B. R-S.; FU, S-H; LIU, H-S. Loofa sponge as a scaffold for the culture of human hepatocyt cell line, **Biotechnology Progress**, v. 19, p. 522-527, 2003.

CLAUSELL, N. Perfil imunoinflamatório no continuum da insuficiência cardíaca, **Revista HCPA**; 25(3):65-70, 2005.

CLOSE, B.; BANISTER, K.; BAUMANS, V.; BERNOTH, E. M.; BROMAGE, N.; BUNYAN, J.; ERHARDT, W.; FLECKNELL, P.; GREGORY, N.; HACKBARTH, H.; MORTON, D.; WARWICK, C. Recommendations for euthanasia of experimental animals: Part 1. DGXI of the European Commission. **Laboratory Animals**, v. 30, p. 293-316, 1996.

CLOWES, A. W.; REIDY, M. A.; CLOWES, M. M. Mechanisms of stenosis after arterial injury, **Laboratory Investigation**, p. 208-15, 1983.

CLOWES, A. W.; SCHWARTZ, S. M. Significance of quiescent smooth muscle migration in the injured rat carotid artery, **Journal of the American Heart Association**, v. 56, p. 139-145, 1985.

COPPOCK, D. L.; KOPMAN, C.; SCANDALIS, S.; GILLERAN, S. Preferential gene expression in quiescent human lung fibroblasts, **Cell Growth & Different Action**, v. 4, p. 483-493, New York, jun. 1993.

CORRADO, E.; RIZZO, M.; COPPOLA, G.; FATTOUCH, K.; NOVO, G.; MARTURANA, I.; FERRARA, F.; NOVO, S. An update on the role of markers of inflammation in atherosclerosis. **Journal of Atherosclerosis and Thrombosis**, v. 17, n. 1, p. 1-11, Palermo, 2010.

DEPARTAMENT OF COMPUTING SCIENCE. FACULTY OF SCIENCE, UNIVERSITY OF ALBERTA. **CMPUT 301**: Introduction to software engineering. Disponível em <<http://ugweb.cs.ualberta.ca/~c301/F07/labs/images/index.html>>. Acesso em: 06 jul. 2010.

EMBRAFARMA. **Gel transdérmico**: organogel ou PLO. Disponível em: <http://www.embrafarma.com.br/v2/admin/_lib/file/doc/smcms/produtos/arquivo/Gel%20transd%C3%A9rmico%20teoria-%20aplica%C3%A7%C3%A3o.pdf>. Acesso em: 10 jun. 2010.

FARHADIAN, F.; CONTARD, F.; SABRI, A.; SAMUEL, J. L.; RAPPAPORT, L. Fibronectina and basement membrane in cardiovascular organogenesis and disease pathogenesis. **Cardiovascular Research**, v. 32, p. 433-442, 1996.

FONSECA, F. L.; BRANDÃO, A. A.; POZZAN, R.; CAMPANA, E. M. G.; PIZZI, O. L.; MAGALHÃES, M. E. C.; FREITAS, E. V. de; BRANDÃO, A. P. Overweight and cardiovascular risk among young adults followed-up for 17 years: the Rio de Janeiro study, Brazil. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 94, n. 2, p. 207-215, 2010.

FONTE MEDICINA DIAGNÓSTICA. **Imuno-histoquímica**. Disponível em: <<http://www.fontemd.com.br/ihq.html>>. Acesso em: 25 jun. 2010.

FUNCTIONX TUTORIALS. **GDI+Acessories**: the color. Disponível em: <<http://www.functionx.com/vcsharp/gdi+/color.htm>>. Acesso em: 02 jul. 2010.

GARCIA, L. da F. R.; LOPES, R. A.; SANTOS, H. S. L. dos; MEZZENA, M. A. Uso de uma técnica histológica adequada para análise microscópica dos tecidos coronarodulares de dentes permanentes, variando-se a solução descalcificadora, **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, Salvador, v. 6, n. 3, p. 306-310, set./dez. 2007.

GIMBRONE JR, M. A., TOPPER, J. N., NAGEL, T., ANDERSON, K. R., GARCIA-CARDEÑA, G. Endothelial dysfunction, hemodynamic forces, and atherogenesis. **Annals New York Academy of Sciences**, Massachusetts, p. 230-240, 2006.

GOTTLIEB; M. G. V.; BONARDI; G.; MORIGUCHI, E. H. Fisiopatologia e aspectos inflamatórios da aterosclerose, **Scientia Medica**, v. 15, n. 3, p. 203-207, Porto Alegre, 2005.

HANSSON, G. K. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. **The New England Journal of Medicine**, v. 352, p. 1685-1695, Massachusetts, 2005.

HECKLER, E. J.; RANCY, P. C.; KODALI, V. K.; THORPE, C. Generating disulfides with dQuiescing-Sulfhydryl Oxidases, **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1783, p.567-577, 2008.

HOOBER, K. L.; JONEJA, B.; WHITE3, H. B.; THORPE, C. A sulfhydryl oxidase from chicken egg withe, **The Journal of Biological Chemistry**, v. 271, n. 48, p. 30510-30516, 1996.

HUANG, A.; XIAO, H.; SAMII, J. M.; VITA, J. A.; KEANEY JUNIOR, J. F. Contrastring effects of thiol-modulating agents on endothelial NO bioactivity, **AJP - Cell Physiology**, v. 281, p. 719-725, 2001.

IMAGE-PRO® PLUS. **Start-up guide**. Version 6.0 for Windows™, Media Cybernetics, Inc., 2005.

JAGADEESHA, D. K.; LINDLEY, T. E.; DELEON, J.; SHARMA, R. V.; MILLER, F.; BHALLA, R. C. Tempol therapy attenuates medial smooth muscle cell apoptosis and neointima formation after balloon catheter injury in carotid artery of diabetic rats. **AJP - Hearth and Circulatory Physiology**, v. 289, p. 1047-1053, 2005.

LABORATÓRIO PREVENÇÃO & DIAGNOSE. **Imunohistoquímica**. Disponível em: <www.prevencaoediagnose.com.br/pdf/art7.pdf>. Acesso em: 10 jun. 2010.

LIBBY, P., THEROUX, P. Pathophysiology of coronary artery disease. **Journal of the American Hearth Associaton**, v. 111, p. 3481-3488, 2005.

LEE; J-E.; HOFHAUS, G.; LISOWSKY, T. Erv1p from saccaromyces cerevisiae is a FAD-linked sufhydryl oxidase, **FEBS Letters**, v. 477, p. 62-66, 2000.

LUZ, P. L. da; SOLIMENE, M. C. Reestenose após angioplastia transluminal coronária: o problema clínico, **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 43, n. 4, p. 357-366, 1997.

MAFFIA, P.; GRASSIA, G.; DI MEGLIO, P.; CARNUCCIO, R.; BERRINO, L.; GARSIDE, P.; IANARO, A.; IALENTI, A. Neutralization of interleukin-18 inhibits neointimal formation in a rat model of vascular injury. **Circulation**, v. 114, p. 430-437, 2006.

MAO; Y.; SCHWARZBAUER, J. E. Fibronectin fibrillogenesis: a cell-mediated matrix assembly process, **Matrix Biology**, v. 24, p. 389-399, 2005.

MARTÍN, A. S.; GRIENDLING, K. K. Redox control of vascular smooth muscle migration, **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 12, n. 5, p. 1-16, 2010.

MERCK. **HE staining procedure**. Disponível em: <<http://uk.vwr-cmd.com/ex/downloads/brochures/clinical/W287121.pdf>>. Acesso em: 10 de junho de 2010.

MUSARD, J. F.; SALLOT, M.; DULIEU, P.; FRAÎCHARD, A.; ORDENER, C.; REMY-MARTIN, J. P.; JOUVENOT, M.; ADAMI, P. Identification and expression of a new sulfhydryl oxidase SOx-3 during the cell cycle and the estrus cycle in uterine cells, **Biochemical and Biophysical Research Communications**, p. 83-91, 2001.

MUSTACICH; D.; POWIS, G. Thioredoxin reductase, **Biochemical Journal**, v. 346, p. 1-8, 2000.

NAKAO, L. S., PEDRO, M. A., LAURINDO, F. R. High expression of quiescin Q6/sulphhydryl oxidase in circulating microparticles from plasma of coronary artery disease patients: a novel redox signaling microenvironment? **Livro de Resumos da SBBq**, T36, p. 243, 2004.

NHLBI (National Heart, Lung, and Blood Institute). **Coronary Angioplasty?** Disponível em: <http://www.nhlbi.nih.gov/health/dci/Diseases/Angioplasty/Angioplasty_All.html>. Acesso em: 25 jun. 2010.

OSTROWSKI, W. S; KISTLER, W. S. Properties of a flavoprotein sulfhydryl oxidase from rat seminal vesicle secretion, **Biochemistry**, v. 19, p. 2639-2645, 1980.

PANKOV; R.; YAMADA, K. M. Fibronectin at a glance, **Journal of Cell Science**, v. 115, p. 3861-3863, 2002.

PELIZZARI, J. V. **Presença e atividade da proteína quiescina sulfidril oxidase no soro fetal e neonatal**. 51 f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – PUC-PR, Curitiba, 2005. Disponível em:

<http://www.biblioteca.pucpr.br/tede/tde_arquivos/12/TDE-2006-02-17T063626Z-279/Publico/Joao%20Vitor%20Cie%20da%20Saude.pdf>. Acesso em: 10 jun. 2010.

PEREIRA, A. H.; GRUDTNER, M. A. (2005) **Angioplastia transluminal percutânea e stents endovasculares**. Disponível em:

http://lava.med.br/livro/pdf/adamastor_angioplastia.PDF. Acesso em: 10 maio 2010.

POLLMAN, M. J.; HALL, J. L.; GIBBONS, G. H. Determinants of vascular smooth muscle cell apoptoses after balloon angioplasty injury: influence of redox state and cell phenotype, **Journal of the American Heart Association**, v. 84, p. 113-121, 1999.

RADOM, J.; COLIN, D.; THIEBAULT, F.; DOGNIN-BERGERET, M.; MAIRET-COELLO, G.; ESNARD-FÈVE, A.; FELLMANN, D.; JOUVENOT, M. Identification and expression of a new splicing variant of FAD-sulfhydryl oxidase in adult rat brain, **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1759, p. 225-233, 2006.

RIBEIRO, J. P.; CLAUSELL, N. Em busca de novos paradigmas para o manejo da cardiopatia isquêmica. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 69, n. 1, p. 1-12, 1997.

ROBBINS, S. L.; ABBAS, A. K.; KUMAR, V.; FAUSTO, N.; MITCHELL, R. N. **Patologia básica**. 8. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008.

ROBBINS, S. L.; COTRAN, R. S.; KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; FAUSTO, N. **Patologia: bases patológicas da doença**. 7. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005.

ROSS, R. Atherosclerosis an inflammatory disease, **The New England Journal of Medicine**, v. 340, n. 2, p. 115-126, 1999.

SHI, Y.; NICULESCU, R.; WANG, D.; PATEL, S.; DAVENPECK, K. L.; ZALEWSKI, A. Increased NAD(P)H oxidase and reactive oxygen species in coronary arteries after balloon injury, **Journal of the American Heart Association**, v. 21, p. 739-745, 2001.

SOUZA, H. P.; LAURINDO, F. R. M.; ZIEGELSTEIN, R. C.; BERLOWITZ, C. O.; ZWEIER, J. L. Vascular NAD(P)H oxidase is distinct from the phagocytic enzyme and modulates vascular reactivity control, **AJP - Heart and Circulatory Physiology**, v. 280, p. 658-667, 2001.

THIESEN, K. **Mecanismos fisiopatológicos do desequilíbrio redox em células neointimais vasculares**. 85 f. Tese (Doutorado em Ciências da Saúde), Faculdade de Medicina, USP, São Paulo, 2007. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/5/5131/tde-27042010-113336/publico/TESEKENYATHIESEN.pdf>>. Acesso em: 10 jun. 2010.

THORPE, C.; COPPOCK, D. L. Generating disulfides in multicellular organisms: emerging roles for a new flavoprotein family, **The Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 19, p. 3929-3933, 2007.

THORPE, C.; HOOBER, K. L.; RAJE, S.; GLYNN, N. M.; BURNSIDE, J.; TURI, G. K.; COPPOCK, D. L. Sulfhydryl oxidase: emerging catalysts of protein disulfide bond formation in eukaryotes, **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 405, p. 1-12, 2002.

TIMM, L. de L. Clínicas rotineiras de preparação e análise de lâminas histológicas, **Caderno La Salle XI**, Canoas, v. 2, n. 1, p. 231-239, 2005.

TOUCHARD, A. G.; SCHWARTZ, R. S. Preclinical restenosis models: challenges and successes, **Toxicologic Pathology**, v. 34, p. 11-8, 2006.

TULIS, D. A. Rat carotid artery balloon injury model. In: SREEJAYAN, N.; REN, J. (Ed.) **Methods in molecular medicine: vascular biology protocols**. Totowa: Humana Press, 2007. cap. 1.

TURY, A.; MAIRET-COELLO, G.; PONCET, F.; JACQUEMARD, C.; RISOLD, P. Y.; FELLMANN, D.; GRIFFOND, B. QSOX sulfhydryl oxidase in rat adenohypophysis: localization and regulation by strogens, **Journal of Endocrinology**, v. 183, p. 353-363, 2004.

WALSH, K.; SMITH, R. C.; KIM, H-S. Vascular cell apoptosis in remodeling, restenosis, and plaque rupture, **Journal of the American Heart Association**, v. 87, p. 184-188, 2000.

WARD, M. R.; PASTERKAMP, G.; YEUNG, A. C.; BORST, C. Arterial remodeling: mechanisms and clinical implication, **Journal of the American Heart Association**, v. 102, p. 1186-1191, 2000.

WEINTRAUB, N. L. NOX response to injury, **Journal of the American Heart Association**, v. 22, p. 4-5, 2002.

WIERZBICKA-PATYNOWSKI, I.; SCHWARZBAUER, J. E. The ins and outs of fibronectin matrix assembly, **Journal of Cell Science**, v. 116, p. 3269-3276, 2003.

WITTKE, I.; WIEDEMEYER, R.; PILLMANN, A.; SAVELYEVA, L.; WESTERMANN, F.; SCHWAB, M. Neuroblastoma-derived sulfhydryl oxidase: a new member of the sulfhydryl oxidase/quiescin6 family, regulates sensitization to interferon γ - induced cell death in human neuroblastoma cells, **Cancer Research**, v. 63, p. 7742-7752, 2003.

ZANATA, S. M.; LUVIZON, A. C.; BATISTA, D. F.; IKEGAMI, C. M.; PEDROSA, F. O.; SOUZA, E. M.; CHAVES, D. F.; CARON, L. F.; PELIZZARI, J. V.; LAURINDO, F.R.; NAKAO, L. S. High levels of active quiescin Q6 sulfhydryl oxidase (QSOX) are selectively present in fetal serum, **Redox Report Journal**, v. 10, n. 6, p. 319-323, 2005.

ZARGHAM, R.; THIBAUT, G. $\alpha 8\beta 1$ Integrin expression in the rat carotid artery: involvement in smooth muscle cell migration and neointima formation, **Cardiovascular Research**, v. 65, p. 813-822, 2005.

ZARGHAM; R.; WAMHOFF, B. R.; THIBAUT, G. RNA interference targeting $\alpha 8$ Integrin attenuates smooth muscle cell growth, **FEBS Letters**, v. 581, p. 939-943, 2007.

ANEXOS

Anexo 1 – Certificado do Comitê de Ética



Ministério da Educação
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
Setor de Ciências Biológicas
Comitê de Ética em Experimentação Animal
(CEEA)



CERTIFICADO

O Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA) do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, instituído pela PORTARIA Nº 787/03-BL, de 11 de junho de 2003, com base nas normas para a constituição e funcionamento do CEEA, estabelecidas pela RESOLUÇÃO Nº 01/03-BL, de 09 de maio de 2003 e considerando o contido no Regimento Interno do CEEA, **CERTIFICA** que os procedimentos utilizando animais no projeto de pesquisa abaixo especificado, estão de acordo com os princípios éticos estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e exigências estabelecidas em "Guide for the Care and Use of Experimental Animals (Canadian Council on Animal Care)".

CERTIFICATION

The Ethics Animal Experiment Committee of the Setor de Ciências Biológicas of the Federal University of Paraná, established by the DECREE Nº 787/03-BL on June 11th 2003, based upon the RESOLUTION Nº 01/03-BL from May 9th 2003, and upon the CEEA internal regiment, **CERTIFIES** that the procedures using animals in the research project specified below are in agreement with the ethical principals established by the Experimental Animal Brazilian Council (COBEA), and with the requirements of the "Guide for the Care and Use of Experimental Animals (Canadian Council on Animal Care)".


PROCESSO: 23075.107019/2009-54

APROVADO: 10/11/2009 – R.O. 10/2009

TÍTULO: Efeito da supressão do gene QSOX-1 (quiescina/sulfidril oxidase) na reestenose pós-lesão por cateter-balão em carótidas de rato

AUTORES: Lia Sumie Nakao, Axel Helmut Rulf Cofré

DEPARTAMENTO: Patologia Básica


Prof. Dr. Aleksander Roberto Zampronio
Coordenador do CEEA